



Francisco José Barros Lobão **Valor do MALDI-TOF no diagnóstico bacteriológico na fibrose quística**



Francisco José Barros Lobão **Valor do MALDI-TOF no diagnóstico bacteriológico na fibrose quística**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Manuela Machado Ribeiro, Assistente Hospitalar Graduada de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João, EPE e da coorientação da Professora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Professora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Cidália Irene Azevedo Pina Vaz

Assistente Hospitalar Graduada de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João, EPE e
Professora Associada de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Orientador

Professora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João, EPE, Professor Doutor João Tiago Guimarães, por consentir a concretização deste estudo.

A minha orientadora, Doutora Maria Manuela Machado Ribeiro, pela sua orientação, empenho, dedicação, críticas e opiniões ao longo deste trabalho.

A minha coorientadora, Professora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, pelo acompanhamento, ajuda e disponibilidade.

A todos os elementos que comigo trabalharam no Laboratório de Microbiologia do Hospital de São João, com um agradecimento muito especial a todos os Técnicos de Análises Clínicas e de Saúde Pública que me acolheram. Um sincero muito obrigado!

A minha família que mesmo longe esteve presente, apoiando-me e incentivando-me. Meus pais estarão sempre comigo.

palavras-chave

Fibrose quística; Bacilos Gram negativo não fermentadores; MALDI-TOF MS; VITEK® 2; VITEK® MS

resumo

A fibrose quística é a doença hereditária autossômica recessiva frequentemente associada à raça caucasiana. Atualmente, a principal causa de morbilidade e mortalidade é o declínio gradual da função pulmonar devido à colonização crónica por diversas bactérias e fungos, onde os bacilos Gram negativo não fermentadores têm um papel fundamental.

O objetivo deste trabalho é comparar duas tecnologias diferentes de identificação bacteriana, na sua capacidade de fornecer uma identificação o mais completa e fidedigna possível, dos bacilos de Gram negativo não fermentadores, em doentes com fibrose quística. Dentro deste objetivo, pretendia-se avaliar o impacto e possível introdução da tecnologia MALDI-TOF MS na rotina de um grande hospital.

Para isso, foi realizada uma recolha de dados dos resultados bacteriológicos das amostras respiratórias de 85 doentes com fibrose quística do Centro Hospitalar de São João, EPE.

De janeiro de 2002 a 28 de fevereiro de 2013 foram analisados os microrganismos isolados em 1000 amostras, utilizando o VITEK® 2, onde 77,5% dos isolamentos foram identificados ao nível da espécie, 12% ao nível do complexo e 6,7% ao nível do género, não tendo identificado a bactéria em 3,8%. Entre 01 de março de 2013 e 08 de agosto de 2014 foram analisadas 175 amostras usando o VITEK® MS, obtendo uma identificação ao nível da espécie em 73,1% das vezes, 6,3% ao nível do complexo e 20,6% ao nível do género.

Assim, é possível concluir que a introdução da tecnologia MALDI-TOF MS permitiu um melhoramento na identificação bacteriana, com a vantagem de fornecer uma identificação fidedigna em apenas alguns minutos e utilizando uma pequena quantidade de inóculo. No entanto, constatou-se que há necessidade de melhorar a base de dados para alguns géneros de bacilos Gram negativo não fermentadores, de forma a possibilitar uma identificação ainda mais eficaz.

keywords

Cystic fibrosis; non-fermenting Gram negative bacilli; MALDI-TOF MS; VITEK® 2; VITEK® MS

abstract

Cystic fibrosis is the most frequent autosomal recessive hereditary disease in Caucasian race. Gradual decline of pulmonary function originated by chronic bacteria and fungi colonization is the leading cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis and non-fermenters bacilli have a fundamental role in the colonization.

The objective of this work is compare two different bacteria identification technologies through the ability to provide the most complete and reliable identification possible of non-fermenters Gram negative bacilli in cystic fibrosis patients. Within this aim, the intention was evaluate the impact and possible introduction of MALDI-TOF MS technology in the routine of a large hospital.

To achieve that goal, a data collection of bacteriological results from respiratory samples of 85 cystic fibrosis patients from Centro Hospitalar de São João, EPE was performed.

Between January 02 2002 and February 28 2013, microorganisms isolated in 1000 samples were analysed using VITEK® 2, which identified at species level in 77.5%, 12% at complex level and 6.7% at genus level, and in 3.8% of cases no identification was made. Between March 01 2013 and August 08 2014 have been analysed 175 samples using VITEK® MS and it proceed the identification at species level in 73.1%, 6.3% at complex level and 20.6% at genus level.

Thus, it is possible to conclude that MALDI-TOF MS technology has enabled an improvement in bacterial identification, taking the advantage of providing an identification in just a few minutes. However, it is necessary to improve the database for some genera of non-fermenters Gram negative bacilli, in order to permit a more efficient identification.

Índice

Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
1 Revisão bibliográfica	1
1.1 Introdução	2
1.2 Genética da fibrose quística	5
1.2.1 Transmissão.....	5
1.2.2 Gene CFTR	5
1.2.3 Proteína CFTR.....	6
1.3 Epidemiologia da fibrose quística.....	10
1.4 Patogénese da fibrose quística	12
1.4.1 Sistema respiratório.....	12
1.4.2 Aparelho digestivo	13
1.4.3 Infertilidade	15
1.4.4 Alterações músculo-esqueléticas.....	15
1.5 Diagnóstico da fibrose quística.....	16
1.5.1 Demonstração de função anormal do gene CFTR	17
1.5.2 Testes complementares de avaliação do fenótipo	19
1.5.3 Rastreio pré-natal e neonatal	20
1.6 Microbiologia da fibrose quística	21
1.6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.6.2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	24
1.6.3 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	24
1.6.4 Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	24
1.7 Métodos de identificação	26

1.7.1	MALDI-TOF MS	27
2	Justificação do tema e objetivos	31
2.1	Justificação do tema.....	32
2.2	Objetivo geral	32
2.2.1	Objetivo específico.....	32
3	Materiais e métodos	33
3.1	Materiais	34
3.2	Métodos	34
3.2.1	Amostras.....	34
3.2.2	Amostra – cultura e isolamento.....	34
3.2.3	Identificação – VITEK [®] MS	35
3.3	Análise dos resultados	36
3.4	Questões éticas.....	36
4	Resultados.....	37
4.1	Desempenho global do VITEK [®] 2 e VITEK [®] MS	39
4.2	Impacto da introdução do equipamento VITEK [®] MS	40
5	Discussão	41
6	Conclusões, limitações e sugestões	45
6.1	Conclusões	46
6.2	Limitações.....	47
6.3	Sugestões	47
7	Bibliografia	48

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática do padrão de herança da FQ	5
Figura 2: Representação esquemática do cromossoma 7 e localização do gene CFTR.....	6
Figura 3: Modelo 3D da proteína CFTR na membrana celular.....	7
Figura 4: Tipos de mutações na FQ	7
Figura 5: Prevalência da FQ em recém-nascidos e respetivas mutações mais comuns em diferentes países.....	10
Figura 6: Idade do diagnóstico da FQ nos Estados Unidos da América em 2005	17
Figura 7: Epitélio das vias respiratórias num indivíduo saudável (a) e com FQ (b)	21
Figura 8: Modelo esquemático dos eventos patogénicos que conduzem à infeção crónica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas vias respiratórias de pacientes com FQ	22
Figura 9: Prevalência dos agentes patogénicos mais comuns na FQ em função da idade. 22	
Figura 10: Evolução da identificação bacteriana	27
Figura 11: Esquema da análise de amostras microbiológicas por MALDI-TOF MS.....	30
Figura 12: Percentagem e respetiva frequência da identificação dos diferentes equipamentos ao nível do género, complexo e da espécie e de isolamentos não identificados	39
Figura 13: Frequência e respetiva percentagem dos diferentes géneros nos diferentes equipamentos.....	39
Figura 14: Frequência e respetiva percentagem das diferentes espécies/complexo nos diferentes equipamentos	40
Figura 15: Identificação de BGNF pelos equipamentos VITEK [®] 2 (círculo verde) e VITEK [®] MS (círculo azul) em três doentes diferentes	40

Índice de tabelas

Tabela 1: Características clínicas da FQ	12
Tabela 2: Critérios para o diagnóstico da FQ	16
Tabela 3: Taxa de detecção da FQ em diferentes etnias	18
Tabela 4: Bactérias isoladas e respetiva frequência no VITEK® 2 e VITEK® MS.....	38

Lista de abreviaturas

Abreviaturas	Significado
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BGNNF	Bacilos Gram negativo não fermentadores
BGNNI	Bacilo Gram negativo não identificado
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECFS	<i>European Cystic Fibrosis Society</i>
FQ	Fibrose quística
GN	Gram negativo
GP	Gram positivo
IPE	Insuficiência Pancreática Exócrina
IRT	Tripsina Imunorreativa
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass</i>
MS	<i>Spectrometry</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de Massa
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDN	Potencial Transepitelial Nasal
Pi	Composto inorgânico
PKA	Proteína Cinase A
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido Ribonucleico
TOF	Tempo de Voo

1 Revisão bibliográfica

1.1 Introdução

A fibrose quística (FQ) é a doença hereditária com carácter autossómico recessivo mais frequente na raça caucasiana, caracterizando-se pela existência de uma mutação no braço longo do cromossoma sete (1).

Existem referências sobre esta patologia já na Idade Média no folclore popular do Norte da Europa, onde as crianças cuja pele tinha um paladar salgado faleciam cedo. Contudo, apenas passado muito tempo, na década 30 do século XX, foi utilizada pela primeira vez a designação de FQ do pâncreas, por Anderson, para designar uma doença em que se descreviam áreas de fibrose nesse órgão associadas a dilatação quística dos ductos pancreáticos (2). Em 1944, Farber utilizou o termo mucoviscidose como sinónimo da FQ, devido às características das secreções que se apresentavam espessas e viscosas, afirmando que a FQ era uma doença generalizada que afetava as glândulas secretoras (3). O diagnóstico era realizado com base nas características clínicas (4).

Em 1948, durante uma onda de calor, Paul di Sant'Agnese apurou que o suor de crianças com FQ tinha um excesso de sódio e cloreto, verificando-se assim o envolvimento da glândula sudorípara (5). Esta situação levou ao desenvolvimento do teste de suor por Gibson e Cooke em 1959, o que permitiu um melhoramento na deteção da FQ (6).

No ano de 1979, Crossley *et al*, verificaram que a tripsina imunorreativa (IRT) se encontrava elevada em recém-nascidos diagnosticados com FQ, tornando-se a sua medição no primeiro rastreio neonatal da FQ (7). Na década de 80 do século XX, voltou a haver avanços: em 1983, Quinton, Knowles e Bouchin descreveram a existência de um canal iónico no epitélio dos canais sudoríparos que condicionava uma alteração na reabsorção do cloro; e em 1989, o gene responsável pela mutação (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* – CFTR), foi identificado pela primeira vez (8), permitindo associar algumas características fenotípicas da FQ com o genótipo, revelando um amplo espectro de fenótipos (9).

Desde a descoberta do gene, este tem sido alvo de rastreio pré-natal e neonatal em diversos países devido à sua elevada frequência. Em 1997, diferentes Institutos Nacionais de Saúde convocaram uma Conferência de Consenso sobre a FQ, com o objetivo de criar *guidelines* para a implementação do rastreio pré-natal. Assim, foi recomendado que o rastreio seja utilizado em indivíduos com história familiar de FQ e casais que planeiam uma

gravidez ou que procurem assistência pré-natal. No entanto, a implementação de um rastreio acarreta alguns inconvenientes devido ao grande número de mutações no gene CFTR, à diferente frequência das mutações nos vários grupos étnicos, demográficos e raciais, a relação inconsistente entre genótipo-fenótipo para mutações particulares e nem todas as mutações CFTR provocam FQ (10). Em 2001, o *American College of Medical Genetics Cystic Fibrosis Carrier Screening Working Group* apresentou um conjunto de diretrizes para a implementação do rastreio pré-natal de FQ, incluindo o painel de mutações e variantes do gene CFTR que deveriam ser testadas como componente integrante dos programas de rastreio (11).

O gene CFTR é responsável pela codificação de uma proteína, denominada CFTR, que controla um canal iónico de cloretos e sódio localizado na membrana apical das células dos epitélios de diferentes órgãos. Assim, devido à ampla distribuição epitelial desta proteína, esta doença tem um carácter sistémico e consequentemente múltiplas manifestações clínicas de gravidade variável (4).

A principal causa de mortalidade da FQ é a insuficiência respiratória devido à inflamação crónica do trato respiratório, que surge com a colonização crónica por diversos agentes patogénicos (12). Por isso, o exame bacteriológico de amostras do trato respiratório de indivíduos com FQ é extremamente relevante para tratamento das situações de infeção e para conhecimento da população colonizadora de cada doente (13). Assim, a exata identificação desses patogénios é fundamental para o tratamento da infeção, seja como orientação para o uso adequado de antibióticos, ou na aplicação adequada de medidas de controlo (14).

A Microbiologia Clínica tem evoluído lentamente e as metodologias desenvolvidas no século XIX continuam a desempenhar um papel central no diagnóstico e posteriores respostas terapêuticas. A Microbiologia Clássica baseia-se no crescimento dos microrganismos em meios de cultura, semelhante ao utilizado por Pasteur e Koch, e esta metodologia não é apenas utilizada para a identificação, mas também para a realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. Num laboratório de bacteriologia depois da receção do produto, as amostras são submetidas à coloração de Gram e microscopia, semeadas em meios de cultura sólidos e/ou líquidos e, após a incubação com duração, temperatura e ambiente adequado, o crescimento microbiano é avaliado. Nas amostras com crescimento, os microrganismos patogénicos passam por uma caracterização adicional

através da utilização de testes bioquímicos manuais ou automáticos e, a seguir, é realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (métodos manuais ou automáticos) (15).

Contudo, desde a introdução de métodos imunológicos, foram observadas diversas inovações na detecção dos microrganismos (15). Nos últimos anos a tecnologia *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) tem sido cada vez mais utilizada em laboratórios de Microbiologia Clínica na identificação dos microrganismos (16).

A espectrometria de massa (MS) é usada há décadas em química, mas apenas em 1975 foi descrita pela primeira vez a sua utilização para caracterização de microrganismos por Anhalt e Fenselau, quando observaram que bactérias de diferentes géneros e espécies produziam diferentes espectros de massa. Na década de 80 do século XX, houve o desenvolvimento de técnicas de desorção/ionização que promovem a criação de iões de biomarcadores moleculares dos microrganismos, levando à formação de perfis bacterianos. Inicialmente, eram analisadas moléculas de baixo peso molecular (como por exemplo os lípidos) (17) e com a introdução de técnicas de ionização suave, como a *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) em 1985, foi possível analisar moléculas de elevado peso molecular (como proteínas) (18). Em 1988, surgiu uma nova abordagem, por Koichi Tanaka, que utilizava um analisador “tempo de voo” (TOF) (19) e o constante progresso da tecnologia MALDI-TOF MS, permitiu que esta fosse aplicada na análise de uma grande variedade de biomoléculas (20), tornando-se numa das principais ferramentas analíticas na investigação biomédica e biológica até ao final do século XX (21). Porém, a introdução desta tecnologia na rotina laboratorial só se iniciou em 2004, quando a primeira base de dados de identificação bacteriana foi descrita (22).

1.2 Genética da fibrose quística

1.2.1 Transmissão

A FQ é uma doença hereditária, autossômica recessiva, ou seja, para que um indivíduo manifeste a doença é necessário que sejam transmitidas duas cópias do gene alterado. Assim, num casal de portadores, o risco de FQ na descendência é de 25%, 50% serão portadores e 25% não terá qualquer mutação (4) (figura 1).

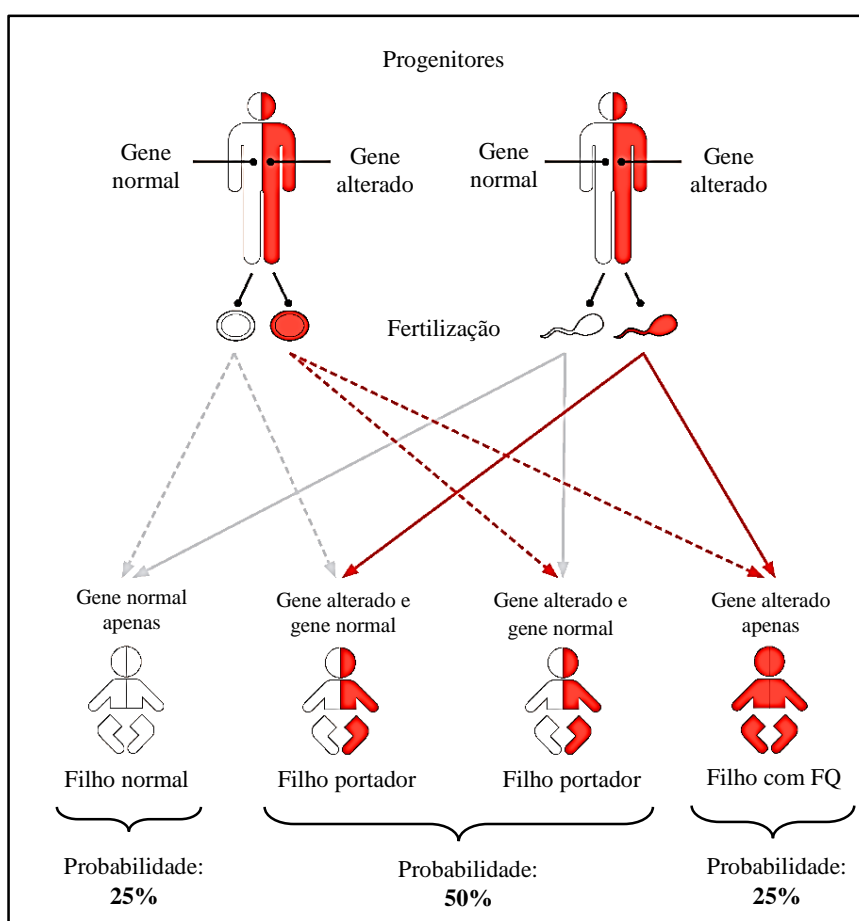


Figura 1: Representação esquemática do padrão de herança da FQ (23)

1.2.2 Gene CFTR

O gene da FQ é formado por 230kb com 27 exões localizados em 7q31.2 (24) (figura 2) e codifica um ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de 6,5kb que transcreve uma proteína reguladora da condutância transmembranar (25) com 1480 aminoácidos denominada CFTR (24).

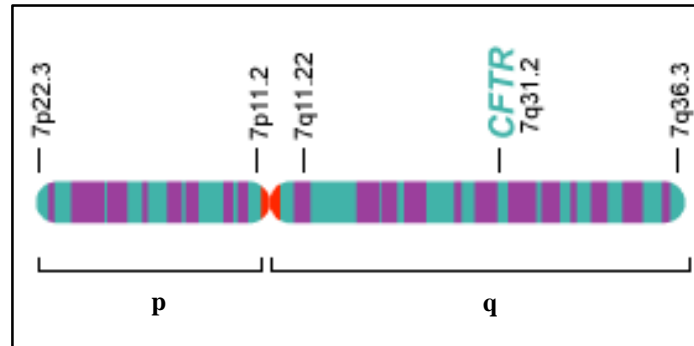


Figura 2: Representação esquemática do cromossoma 7 e localização do gene CFTR (26)

Atualmente encontram-se descritas mais de 2000 mutações do gene (25) e pelo menos 1500 são responsáveis pelo desenvolvimento de FQ (27), sendo que a sua denominação descreve a alteração na sequência ao nível do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) ou proteína (28).

1.2.3 Proteína CFTR

Esta proteína pertence à Superfamília de Transportadores *ATP binding cassette* (29) que é responsável por um conjunto de funções vitais, como o transporte de nutrientes, libertação de toxinas e a comunicação intercelular em eucariontes, eubactérias e arqueobactérias. São responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de solutos através das membranas biológicas, incluindo açúcares, aminoácidos, aniões, cromóforos, drogas, peptídeos, proteínas e lípidos (30).

A CFTR encontra-se na membrana apical das linhas celulares epiteliais das vias respiratórias, árvore biliar, intestinos, vasos deferentes, ductos sudoríparos e ductos pancreáticos, sendo responsável pelo transporte de aniões de cloreto para dentro e fora da célula (31). Esta proteína possui dois domínios transmembranares (TM₁ e TM₂) com seis segmentos cada, dois domínios de ligação a nucleótidos (NBD₁ e NBD₂) e um domínio regulatório (R) (figura 3), que é ativado pela fosforilação proteína cinase A (PKA) (32). Os domínios transmembranares contribuem para a formação do poro do canal de cloreto; os domínios de ligação a nucleótidos são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP, que fornece a energia para a atividade do canal; o domínio regulatório controla a atividade do canal CFTR (33).

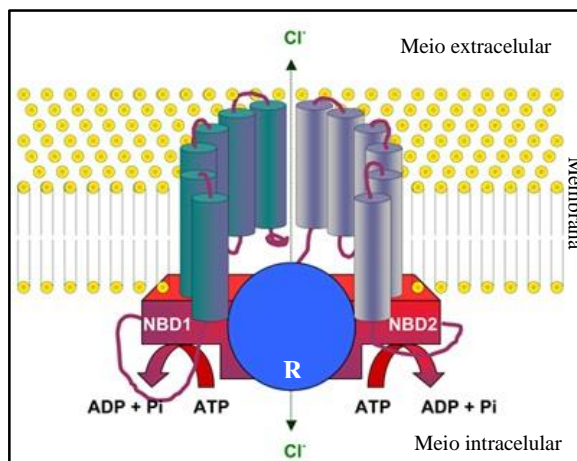


Figura 3: Modelo 3D da proteína CFTR na membrana celular (34)

A ativação do canal de cloreto inicia-se com a fosforilação do domínio R pela PKA dependente da adenosina monofosfato cíclico (cAMP), permitindo a ligação do ATP ao NBD1. Assim que a adenosina trifosfato (ATP) é hidrolisada pelo NBD1, o canal abre e os aniões passam pela membrana de acordo com o gradiente eletroquímico, através do poro formado por TM₁ e TM₂. Quando o domínio R se encontra completamente fosforilado, o NBD2 liga-se ao ATP, o que permite estabilizar o canal. Logo que o ATP é hidrolisado pelo NBD2, a adenosina difosfato (ADP) e um composto inorgânico (Pi) são libertados por ambos os NBD e o canal é fechado (35).

As mutações que afetam a proteína CFTR são divididas em seis classes, de acordo com os efeitos sobre a produção e/ou atividade da proteína (36) (figura 4).

Classe da mutação						
Normal	I	II	III	IV	V	VI
Defeito molecular	Ausência de síntese	Processamento incorreto	Regulação incorreta	Diminuição da condutância	Diminuição da síntese	Diminuição da estabilidade
Alteração funcional	CFTR não é sintetizada	<i>Folding</i> defeituoso	Defeito na abertura do canal	Defeito no transporte de iões	Diminuição da síntese de CFTR	Tempo de vida reduzido

Figura 4: Tipos de mutações na FQ (37)

Classe I

Inclui as mutações que dão origem aos fenótipos mais severos da doença, resultando na ausência de síntese da proteína (38), devido à formação de sinais de terminação prematuros (39). Como consequência, são formados transcritos instáveis e/ou proteínas aberrantes possuindo deleções ou novas sequências de aminoácidos. A segunda mutação mais frequente nos pacientes com FQ faz parte desta classe: G542X, onde ocorre a substituição de uma glicina por um codão *STOP* na posição 542 (40).

Classe II

Nesta classe encontram-se associadas as mutações que causam defeitos no processamento das proteínas dando origem a proteínas imaturas que ficam retidas no retículo endoplasmático (41). A maioria das mutações descritas incluem-se nesta classe, sendo um exemplo a mutação F508del, deleção de 3 nucleótidos que formam o codão para fenilalanina (40).

Classe III

As mutações desta classe produzem uma proteína CFTR que é processada no citoplasma e transportada para a membrana das células apicais, que é resistente à fosforilação ou ligação do ATP (42). A consequência dessa resistência é a alteração da regulação do canal iônico e diminuição da sua atividade. A mutação G551D, alteração de uma glicina para ácido aspártico no codão 551, é um exemplo de mutação desta classe e é a terceira mutação mais frequente em doentes com FQ (40).

Classe IV

Afeta os aminoácidos localizados no poro do canal, dando origem a uma diminuição da condutância (fluxo dos eletrólitos através dos canais iônicos é menor) (43). Alguns exemplos de mutações desta classe incluem a substituição da arginina pela histidina no resíduo 117 (R117H), triptofano na posição 334 (R334W) ou prolina no 347 (R347P) (40).

Classe V

Estas mutações produzem uma reduzida quantidade do transcrito CFTR e baixos níveis de proteínas funcionais que são transportadas para a membrana celular (44). Neste grupo,

estão incluídas mutações *missense*, como por exemplo A455E (substituição de um ácido glutâmico por uma alanina), mutações que alteram o promotor da transcrição, como 125 G→C, troca de guanina por citosina na posição 125 (40), e mutações que afetam locais de *splicing*, como é o caso de 3849+10kb C→T, que gera uma nova área com 10kb na posição 3849 (27).

Classe VI

Interferem com a estabilidade da proteína CFTR, através da remoção dos resíduos 70-98 da extremidade C-terminal da proteína (indispensável para a manutenção da estabilidade do complexo CFTR glicosilado), reduzindo o tempo de vida da proteína. Um exemplo de uma mutação é a Q1412X, substituição de uma glutamina por um codão *STOP* na posição 1412, que resulta na ausência de 70 aminoácidos na proteína (40).

As mutações da proteína CFTR podem ser, igualmente, classificadas de acordo com o efeito que produzem na proteína funcional e consequente manifestação clínica daí resultante como severas ou moderadas. Usualmente, as mutações severas resultam na ausência de síntese ou bloqueio do processamento (classes I, II e III), enquanto as mutações moderadas alteram a condução ou redução da síntese (classes IV, V e VI) (45).

A mutação mais frequente pertence à classe II (F508del), representando aproximadamente 70% das mutações dos doentes com FQ em todo o mundo. Em Portugal, essa mutação representa 52% das mutações, sendo que as restantes têm uma frequência rara; a segunda mutação mais frequente é a A561E (troca do aminoácido alanina pelo ácido glutâmico na posição 561) e corresponde apenas a 3% da população (46).

1.3 Epidemiologia da fibrose quística

É uma doença crónica que afeta principalmente indivíduos de raça caucasiana (47), correspondendo a 93,7% dos doentes com FQ (4). Esta doença é igualmente comum em ambos os sexos (47), onde aproximadamente 52% dos doentes são do sexo masculino e 48% do sexo feminino. A FQ tem uma incidência de 1:2000-3000 nascimentos por ano: 1:25 pessoas são portadoras do gene mutado (4).

Contudo, esta incidência varia muito de país para país, de acordo com os antecedentes étnicos (figura 5). A nível europeu, verifica-se que o país com maior incidência é a Irlanda com um valor de 1:1400 e do lado oposto está a Finlândia com um valor de 1:25000 (4). Um exemplo de grande variação dentro do próprio país são os Estados Unidos da América, onde a frequência da doença em americanos brancos é de 1:3000, em latino-americanos é de 1:4000-10000 e em afro-americanos é de 1:15000-20000. A FQ afeta também indivíduos do continente africano e asiático, mas numa taxa muito inferior, afetando, por exemplo, 1:350000 no Japão. Em Portugal, essa incidência é de 1:6000 (48).

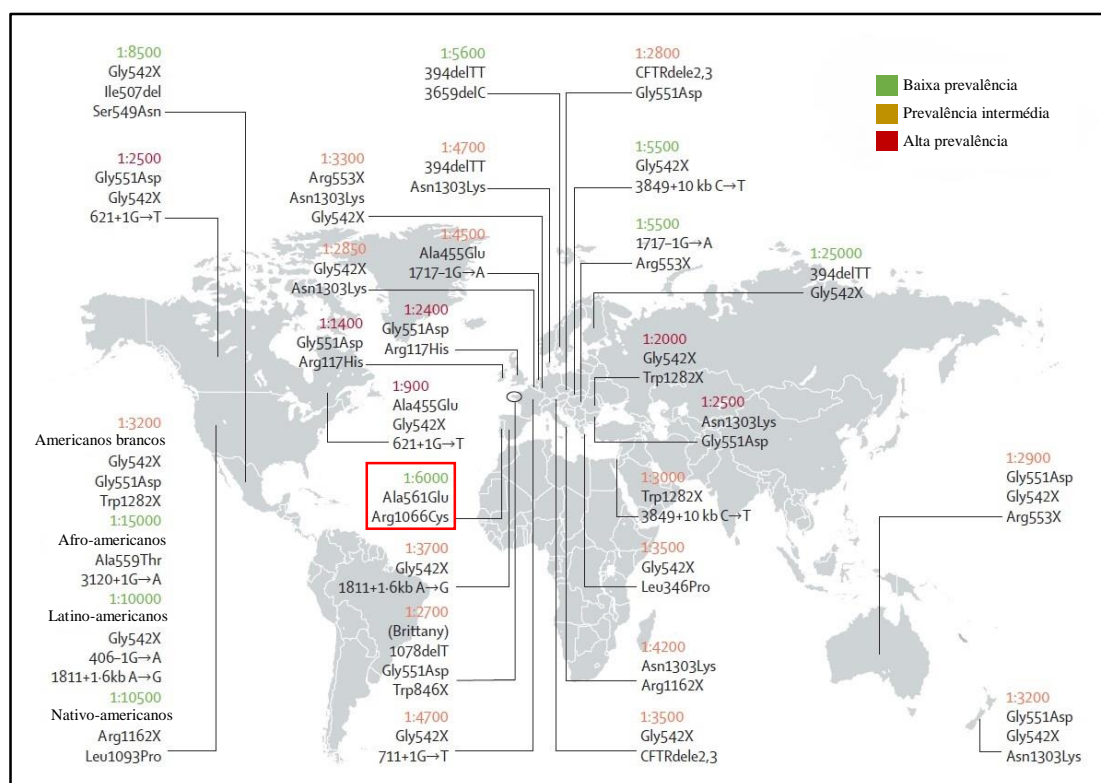


Figura 5: Prevalência da FQ em recém-nascidos e respetivas mutações mais comuns em diferentes países (48)

Tem-se verificado um aumento do número de doentes com diagnóstico de FQ e, segundo a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF), aproximadamente 41,8% dos doentes tem mais de 18 anos. Esta situação deve-se ao aumento da sobrevivência dos doentes: em 1938, menos de 50% dos doentes sobreviviam para além de um ano de vida (4), em 1970 a esperança média de vida era de 16 anos e, atualmente, ronda os 36,8 anos (4,25). De entre os doentes com FQ, 64% têm idades compreendidas entre os 18-29 anos, 25% entre 30-39 anos, 10% entre 40-49 anos e 2% têm mais de 50 anos (4).

1.4 Patogénese da fibrose quística

A glândula sudorípara normal produz um líquido isotónico graças ao conteúdo em cloro e sódio, contudo, quando ocorre uma mutação da CFTR e respetiva perda da função, o cloro não entra na célula, tal como o sódio, dando origem a um suor “salgado” (49).

A patogénese da FQ é muito variável e pode aparecer no período neonatal ou na fase adulta. Alguns pacientes são completamente assintomáticos por vários anos e os sinais clínicos mais comuns incluem tosse, diarreia crónica e desnutrição; no entanto, a doença pode aparecer com outras variantes, podendo afetar vários órgãos e sistemas (33) (tabela 1).

Tabela 1: Características clínicas da FQ (4)

Doença sino-pulmonar
Colonização com agentes bacterianos, como <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>H. influenzae</i>
Tosse persistente, produtiva
Alterações radiológicas persistentes, como bronquiectasias, infiltrados e hiperinsuflação
Obstrução das vias aéreas
Pólipos nasais e alterações radiológicas dos seios perinasais
Hipocratismo digital
Alterações digestivas
Prolapso retal e síndrome de obstrução do intestino distal
Insuficiência pancreática e pancreatite recorrente
Doença hepática crónica com evidência clínica de cirrose biliar ou multilobular
Síndrome de perdas salinas
Alcalose metabólica
Deficiência aguda de sal
Alterações urogenitais
Azoospermia obstrutiva

1.4.1 Sistema respiratório

Mais de 90% da mortalidade da FQ está relacionada com o sistema respiratório (50) e as principais manifestações do foro respiratório incluem tosse persistente, seca de início e depois com broncorreia abundante, sendo que as secreções brônquicas são espessas e

viscosas. Com o evoluir da doença, diminui a capacidade de esforço, despontando a dispneia (51). As exacerbações são caracterizadas por um aumento da produção de secreções, da sua viscosidade e purulência, da tosse, redução da tolerância ao esforço e aumento da dispneia, astenia e perda de peso. Pode ocorrer, ainda, febre, leucocitose, taquicardia e taquipneia e com o agravamento clínico surge hipocratismo digital. A obstrução das vias aéreas conduz a uma hiperinsuflação pulmonar que pode acarretar a deformação da cavidade torácica, com cifose e aumento do diâmetro ântero-posterior. Entre os 5 a 10 anos podem tornar-se evidentes as bronquiectasias quísticas e cilíndricas, principalmente nos lobos superiores. Nos doentes com doença grave, as artérias pulmonares tornam-se mais proeminentes pela hipertensão pulmonar secundária à hipoxemia. Estes doentes desenvolvem um quadro obstrutivo, com aumento do volume residual e redução do fluxo expiratório (52).

A nível gasométrico, pode ocorrer hipoxemia e, numa fase tardia, ocorre hipercapnia, que conjuntamente com a hipoxia crónica levam ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar (53).

As vias aéreas superiores também apresentam frequentemente alterações. A maioria dos doentes com FQ desenvolve sinusite crónica e 90% a 100% desses doentes apresentam uma pan-opacificação dos seios perinasais. Em 20% a 30% dos doentes ocorre polipose nasal e como consequência da obstrução do sistema de drenagem dos seios perinasais, podem surgir quistos designados de mucocelos (54). Com o agravamento da doença nas vias respiratórias, maior é a probabilidade de ocorrerem complicações respiratórias, tais como pneumotórax e hemoptises. As hemoptises afetam aproximadamente 9,1% dos doentes com FQ, sendo que 4,1% sofre de hemoptise maciça, e o pneumotórax ocorre em 3,4% dos indivíduos; ambas as complicações se correlacionam diretamente com a idade dos doentes (55).

1.4.2 Aparelho digestivo

1.4.2.1 Doença gastrointestinal

Em pacientes com FQ sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, desnutrição e indigestão são frequentes. Além disso, a incidência do refluxo gastroesofágico é superior à da população geral, podendo ser de 30%, e é importante o seu diagnóstico pois pode afetar negativamente a função pulmonar. A síndrome de obstrução do intestino distal ocorre em 3,5% dos doentes com FQ e caracteriza-se pela obstrução do íleo e cólon ascendente. Está

associada a genótipos de pior prognóstico, como doença pulmonar grave, ocorrendo quase exclusivamente em doentes com insuficiência pancreática. O íleo meconial está presente em 10-20% dos recém-nascidos com FQ (4).

As células secretoras exibem alterações na sua função de absorção e todo o processo digestivo é alterado, resultando numa má absorção de nutrientes e desnutrição (56).

1.4.2.2 Doença pancreática

O pâncreas é um dos principais órgãos afetados pela disfunção da proteína CFTR. O pâncreas exócrino é responsável pela produção de enzimas para a digestão dos alimentos no lúmen intestinal e a insuficiência pancreática exócrina (IPE) é uma complicação conhecida da FQ, que leva à perda de gordura nas fezes. A perda da função do pâncreas está associada com todos os genótipos de mutação, levando a insuficiência pancreática (57).

A IPE é considerada a principal causa de má absorção intestinal em doentes com FQ, afetando 85% a 90% dos pacientes, tendo um início precoce (58): sinais e sintomas de má digestão estão muitas vezes presentes no nascimento e, na maioria dos pacientes, durante os primeiros anos de vida (59); em 85% dos doentes a IPE surge no primeiro ano de vida e entre 5% a 10% dos casos manifestar-se-á nos primeiros 10 anos de vida (60).

As manifestações clínicas da IPE só surgem quando a secreção pancreática é inferior a 98% (4) e consistem em esteatorreia, emagrecimento, distensão abdominal, malnutrição e hipovitaminose (48). Em quase 20% dos doentes ocorre prolapso retal secundário a esteatorreia (mais frequente nos primeiros anos de vida) e a pancreatite aguda ocorre em 0,5% dos casos, sendo mais frequente nos doentes com insuficiência pancreática (4).

Devido ao aumento de sobrevida têm surgido novas doenças associadas, sendo a diabetes relacionada com FQ a mais frequente. Esta ocorre em aproximadamente 2% das crianças, 19% dos adolescentes e entre 40 a 50% dos adultos. O seu diagnóstico precoce é fundamental pois está relacionada com um aumento da mortalidade (61).

1.4.2.3 Doença hepatobiliar

As alterações hepáticas primárias na FQ envolvem uma deficiência genética na proteína CFTR que leva à produção de uma secreção biliar mais espessa e quando associada a uma resposta inflamatória resulta em colangite e fibrose biliar (62). Entre 5% a 10% dos pacientes com FQ desenvolvem cirrose multilobular durante a primeira década de vida.

Posteriormente, tendem a desenvolver sinais de hipertensão com complicações, como sangramento das varizes (63). A cirrose, ascite, hipertensão portal, varizes no esófago e hemorragias são complicações de doença hepatobiliar associada a FQ, afetando frequentemente adolescentes e adultos (62).

1.4.3 Infertilidade

A maioria dos homens com FQ (97%) apresenta agenesia do ducto deferente bilateral, resultando em azoospermia obstrutiva (64), sendo considerada uma manifestação clínica que por si só obriga ao despiste de FQ (65).

Embora apresentem um trato genital normal (66), as mulheres com FQ são menos férteis que as mulheres saudáveis devido ao muco uterino, que no período de ovulação se encontra menos fluído (67). Frequentemente, têm alterações menstruais, especialmente se existirem alterações pulmonares graves e nestes casos a incidência de infertilidade é de sensivelmente 20% (68).

1.4.4 Alterações músculo-esqueléticas

Muitos doentes com FQ apresentam doença óssea e articular, como por exemplo baixa densidade mineral óssea (69).

Relativamente às doenças ósseas, como osteopenia ou osteoporose, estas são mais comuns em adultos (38% a 77%) do que em crianças (19% a 67%), tendo uma causa multifatorial, atribuindo-se a fatores como hipovitaminose D, alteração da absorção de cálcio, infeções respiratórias e deterioração da função respiratória (69).

Nas doenças articulares, 30% dos doentes apresentam sintomas inespecíficos e em 2% a 8,5% desponta uma artrite. A idade média de aparecimento é dos 13 aos 20 anos, manifestando-se com incidentes recorrentes de dor articular, inflamação, hipersensibilidade e limitação de movimentos (70). A segunda complicação mais frequente é a osteoartropatia hipertrófica, com uma incidência entre os 2% e 7% e a idade média de aparecimento é por volta dos 20 anos. Esta patologia envolve o osso, as articulações e os tecidos moles (periostite proliferativa crónica), de forma insidiosa e simétrica, afetando ainda os cotovelos, pulsos e joelhos. Raramente afeta as pequenas articulações da mão e o derrame articular é frequente, principalmente nos joelhos. Surge nos doentes com doença pulmonar grave e tende a exacerbar-se com as infeções respiratórias (71).

1.5 Diagnóstico da fibrose quística

Os critérios para o diagnóstico da FQ foram definidos pela CFF, em 1998, sendo positivo na presença de pelo menos um dos critérios de cada um dos grupos (72) apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Critérios para o diagnóstico da FQ (72)

<i>Grupo</i>	Critérios
1	Uma ou mais manifestações fenotípicas características (tabela 1) História familiar positiva Rastreio neonatal positivo
2	Demonstração de função anormal da CFTR: <ul style="list-style-type: none"> • Elevada concentração de cloreto no suor (≥ 60 mmol/L) • Identificação de duas mutações do gene CFTR • Valores anormais na diferença de potencial transepitelial nasal

No entanto, o diagnóstico da FQ nem sempre é fácil. Com a descoberta do gene CFTR, verificou-se a existência de uma grande heterogeneidade das manifestações clínicas, tendo sido dividida em 2 grupos: FQ típica ou clássica e FQ atípica ou não clássica. Os doentes com FQ clássica têm um ou mais aspetos fenotípicos característicos e uma prova de suor ≥ 60 mmol/L, enquanto a FQ não clássica engloba os doentes que têm pelo menos um órgão envolvido e prova de suor normal (<30 mmol/L) ou intermédia (30 a 60 mmol/L). Neste caso, o diagnóstico exige a deteção de uma mutação em cada gene ou pela medição da diferença de potencial transepitelial nasal (PDN) (73). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ser identificado um terceiro grupo como doenças relacionadas com a CFTR, onde são integrados os doentes com envolvimento de um só órgão e onde é detetada pelo menos uma mutação. Este grupo inclui, por exemplo, azoospermia obstrutiva isolada, pancreatite crónica, aspergilose broncopulmonar alérgica, bronquiectasias disseminadas e colangite esclerosante (4).

O diagnóstico de FQ é fundamentalmente clínico e os testes de diagnóstico têm como objetivo a sua confirmação, ou nos casos mais atípicos, o seu apoio ou exclusão, sendo a idade média de diagnóstico de seis meses (4) (figura 6).

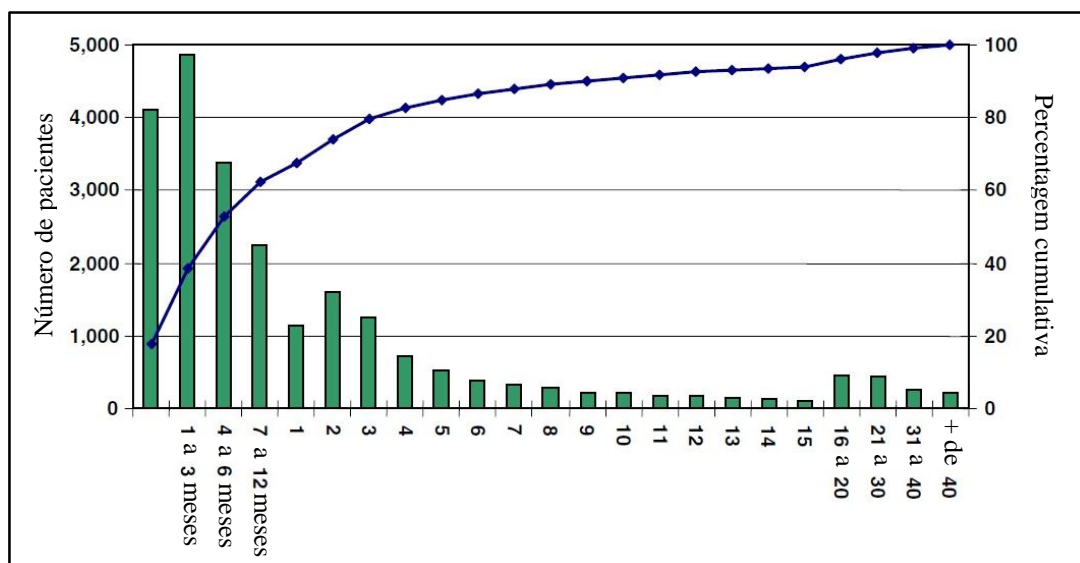


Figura 6: Idade do diagnóstico da FQ nos Estados Unidos da América em 2005 (72)

1.5.1 Demonstração de função anormal do gene CFTR

1.5.1.1 Teste do suor

Este teste é o *gold standard* para o diagnóstico da FQ (6) e consiste na determinação da concentração de cloreto no suor através da estimulação das glândulas sudoríparas pela iontoforese com pilocarpina (74). Aproximadamente 98% do total dos doentes com FQ tem uma prova de suor positiva, reduzindo-se para 90% nos casos de diagnóstico na vida adulta (4). Outro método alternativo é a avaliação da concentração de sódio no suor, já que a diferença entre a concentração do sódio e do cloreto no suor é reduzida (75).

De acordo com a CFF e a *European Cystic Fibrosis Society* (ECFS), os valores de referência de cloreto no suor utilizados no diagnóstico de FQ, em crianças com menos de seis meses, são: normal quando ≤ 29 mmol/L, *borderline* entre 30-59 mmol/L e positivo para FQ quando ≥ 60 mmol/L (74). Contudo, o teste deve ser corretamente interpretado, tendo em consideração a idade do doente; é sugerido, por exemplo, que, em crianças com menos de três meses, uma concentração de cloreto >40 mmol/L é altamente sugestivo de FQ (76).

Como em qualquer técnica, esta está sujeita a erros metodológicos que devem ser considerados, como erros na pesagem e evaporação da amostra, existindo, ainda, patologias que podem influenciar os níveis de eletrólitos no suor, conduzindo a um falso diagnóstico, como a fucosidose e a colestase familiar (76).

1.5.1.2 Genotipagem das mutações do gene

Os painéis de genotipagem têm sido cada vez mais utilizados no diagnóstico precoce de FQ (77). Contudo, a identificação de dois alelos mutados por si só não pode estabelecer o diagnóstico de FQ, nem descartá-lo (76). Esta situação ocorre porque:

- A sensibilidade da análise das mutações é reduzida devido ao elevado número de mutações do gene e, algumas dessas mutações, ocorrem com uma maior frequência ou mesmo exclusivamente em grupos populacionais específicos. Os painéis de triagem disponíveis conseguem detetar, no máximo, 80% a 85% dos alelos mutados (78) (tabela 3).

Tabela 3: Taxa de deteção da FQ em diferentes etnias (79)

Etnia	Taxa de deteção
<i>Judeus Asquenazes</i>	94
<i>Branco não-hispânicos</i>	88
<i>Hispânicos</i>	72
<i>Afro-americanos</i>	64
<i>Ásio-americanos</i>	49

- A análise da mutação do gene CFTR revelou um espectro alargado de fenótipos da FQ, que vão desde as manifestações atípicas (como a ausência congénita bilateral dos vasos deferentes) às mais típicas (tais como insuficiência pancreática). Contudo, com a exceção da insuficiência pancreática, a correlação entre o genótipo e o fenótipo das restantes manifestações de FQ com as diferentes mutações CFTR é ténue. Existem mutações (como por exemplo, R117H) associadas a uma grande amplitude de manifestações clínicas, que vão desde indivíduos saudáveis a indivíduos com manifestações típicas da FQ (76).
- Em casos raros, duas ou mais mutações no mesmo cromossoma podem interagir e modificar o fenótipo, como por exemplo, o alelo R553Q-F508del que reverte/melhora o fenótipo da mutação F508del (76).

1.5.1.3 Medição de diferença de PDN

O epitélio respiratório, incluindo o epitélio nasal, mantém uma PDN que regula o transporte ativo de iões, como o sódio e o cloreto, pela membrana. Esta diferença pode ser medida *in vivo* e encontra-se alterada na FQ, onde existe uma diminuição da secreção de cloreto e um aumento da absorção de sódio (80).

Este teste pode ser útil nos casos em que o teste de suor foi indeterminado e a análise genética pouco reveladora. Contudo, os resultados podem ser influenciados por outras doenças que provocam inflamação da mucosa, como infeções das vias respiratórias superiores, alergias ou pólipos nasais (76).

1.5.2 Testes complementares de avaliação do fenótipo

Existem outros exames, após o diagnóstico inicial, que contribuem na avaliação da gravidade da doença e no planeamento de uma abordagem terapêutica específica. Estes exames complementares incluem a avaliação da função pancreática, do trato respiratório e urogenital (81).

1.5.2.1 Avaliação pancreática exócrina

O teste à função pancreática é importante para confirmar a esteatorreia, consequência da má absorção por IPE presente em 85% a 90% dos doentes com FQ (58).

1.5.2.2 Microbiologia do trato respiratório

A caracterização da flora microbiana do trato respiratório pode ser muito útil na avaliação do desenvolvimento da FQ em doentes com características atípicas. A presença de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* pode indicar um diagnóstico de FQ (78).

1.5.2.3 Avaliação Urogenital

Uma das características mais consistentes da FQ em indivíduos do sexo masculino, após a puberdade, é a azoospermia, estando presente em 98% a 99% dos indivíduos afetados. Na maioria dos casos, a azoospermia ocorre devido canais deferentes rudimentares ou à sua ausência (78).

1.5.3 Rastreio pré-natal e neonatal

O rastreio pré-natal foi introduzido em 2001, tendo como objetivo identificar gravidezes de risco e permitir que os casais possam considerar diversas opções reprodutivas (79). O rastreio pré-natal é indicado quando ambos os progenitores são portadores de mutações no gene e, sendo assim, o feto tem $\frac{1}{4}$ de probabilidade de ser afetado. É importante referir que um teste negativo não garante que o feto não seja afetado, mas diminui o risco (82).

Este rastreio pode ser realizado por dois diferentes métodos: rastreio baseado no casal e rastreio sequencial. No primeiro método, ambos os membros são testados e os resultados são avaliados em conjunto. Este método revela o estado de portador de ambos os membros do casal e prevê com maior segurança o risco para o feto. No segundo método o teste é realizado por um membro do casal, normalmente à mulher e, apenas se este for positivo, é realizado ao outro elemento do casal (82).

Relativamente ao rastreio neonatal, este é benéfico, pois permite o tratamento precoce da FQ, evitando o diagnóstico tardio, reduzindo a morbilidade e a mortalidade (83).

Embora a análise de IRT tenha sido introduzida em 1979, ainda é o método mais utilizado atualmente (84). O tripsinogénio é uma proenzima produzida pelo pâncreas (85), que normalmente atinge o lúmen intestinal onde é ativado para tripsina e, nos pacientes com FQ, a obstrução dos ductos pancreáticos impede a secreção do tripsinogénio e a sua chegada ao intestino, resultando num acumular desta proteína no sangue (86).

1.6 Microbiologia da fibrose quística

O sistema respiratório exibe importantes mecanismos de defesa para evitar a colonização e/ou infecção das vias respiratórias, sendo que, o principal mecanismo é o transporte mucociliar, que elimina as partículas do trato respiratório através da interação entre o muco respiratório e os cílios (87) (figura 7a).

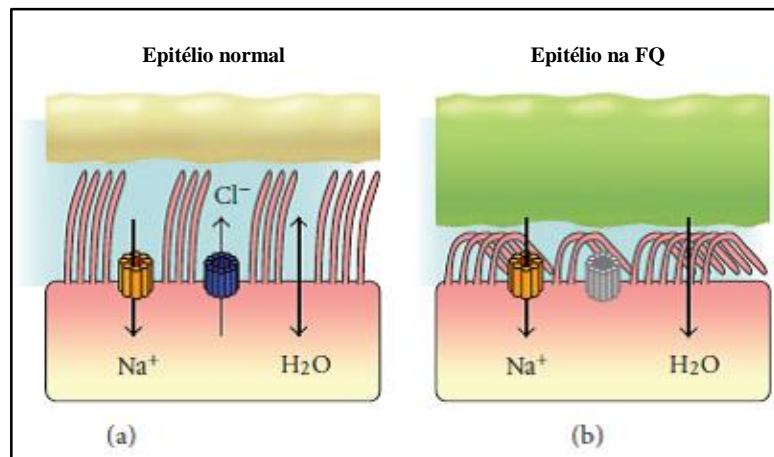


Figura 7: Epitélio das vias respiratórias num indivíduo saudável (a) e com FQ (b) (88)

Contudo, a mutação no gene da FQ altera a proteína CFTR, provocando uma modificação no equilíbrio eletrolítico da mucosa das vias respiratórias, o que irá estimular uma absorção excessiva de água pelo lúmen, resultando num decréscimo de água na superfície fluida das vias aéreas, afetando as propriedades viscoelásticas do muco respiratório (figura 7b). Essas alterações levam ao comprometimento do transporte mucociliar, sendo este o principal fator para o início da colonização bacteriana nas vias aéreas. Posteriormente, os produtos do metabolismo bacteriano causam danos na mucosa respiratória e, com o tempo, a resposta inflamatória contribui para a doença (14) (figura 8).

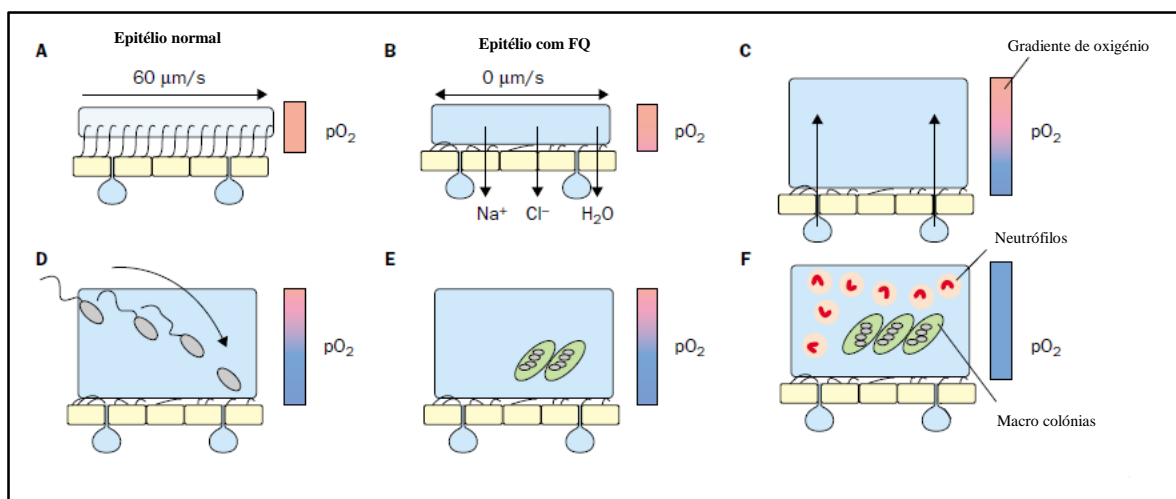


Figura 8: Modelo esquemático dos eventos patogénicos que conduzem à infeção crónica por *Pseudomonas aeruginosa* nas vias respiratórias de pacientes com FQ. Legenda: **A)** Epitélio respiratório normal: a presença de uma camada pouco viscosa de líquido periciliar facilita o movimento de limpeza mucociliar e um consumo normal de oxigénio epitelial não produz gradientes de oxigénio na camada de muco epitelial. **B-F)** Epitélio respiratório na FQ: **B)** Diminuição da remoção do muco de revestimento. **C)** O elevado consumo de oxigénio gera gradientes hipóxicos na camada de muco viscoso. **D)** Bactérias *P. aeruginosa* depositadas na superfície do muco penetram nas zonas hipóxicas da camada de muco. **E)** *P. aeruginosa* adapta-se ao nicho hipóxico e forma macro colónias. **F)** As macro colónias resistem às defesas secundárias, incluindo neutrófilos, dando origem a períodos da infeção crónica (89)

Apesar de uma grande variedade de espécies microbianas ser isolada das secreções respiratórias de pacientes com FQ, apenas algumas espécies desempenham um papel importante na colonização e infeção das vias aéreas e, normalmente, são adquiridos segundo uma sucessão temporal (14) (figura 9).

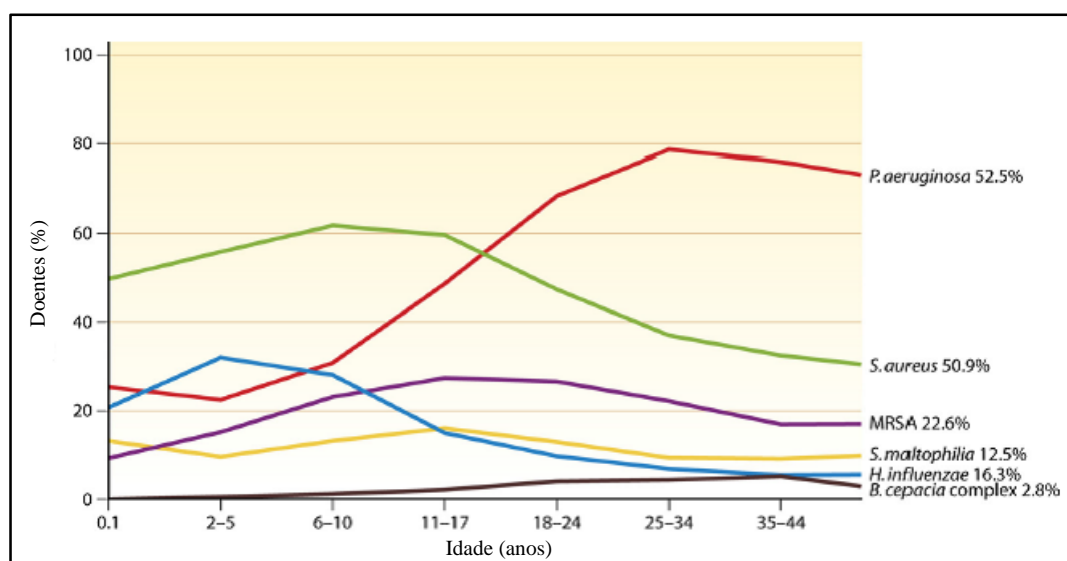


Figura 9: Prevalência dos agentes patogénicos mais comuns na FQ em função da idade (12)

Nos primeiros anos de vida, as infeções víricas podem levar à denudação do epitélio, favorecendo as infeções bacterianas recorrentes e uma inflamação crónica (90). Posteriormente, ocorre a colonização das vias respiratórias por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, sendo rapidamente relegados para segundo plano por *Staphylococcus aureus* (91). Em estadios mais avançados, ocorre um predomínio de *Pseudomonas aeruginosa* (80%), podendo, no entanto, coexistir com o *Staphylococcus aureus*. Por fim e como consequência do tratamento antimicrobiano e da deterioração pulmonar, sucede uma colonização cada vez mais frequente por bacilos Gram negativo não fermentadores (BGNNF), destacando-se o Complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter* spp. (92). A melhoria dos métodos de identificação tem permitido identificar outros BGNNF, como *Ralstonia* spp. (93), juntamente com fungos filamentosos, onde se destaca o *Aspergillus* spp. (94), e micobactérias não tuberculosas, como por exemplo *Mycobacterium gordonae* (95).

1.6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

É o agente patogénico mais comum na FQ e a sua prevalência aumenta com a idade, onde 60% a 85% dos pacientes adultos estão colonizados de forma crónica. Aos 3 anos de idade mais de 95% das crianças têm evidências de infeção por *P. aeruginosa* (96) e a sua prevalência varia com a idade: aos 5 anos chega aos 25% (97), a partir dos 10 anos a sua prevalência supera a do *S. aureus* e, aos 35 anos, está presente em mais de 80% dos doentes (93).

Inicialmente, a colonização é feita pelo fenótipo não mucoide (98) e, após 9-10 anos, surgem as estirpes com fenótipo mucoide, devido à alteração da sua capacidade de crescimento e de se manter nos pulmões dos doentes com FQ: cresce associada a biofilmes e produz alginato (promove a viscosidade das secreções respiratórias e é o principal componente da matriz do biofilme) (99). Nestas condições, a infeção é crónica, visto que é praticamente impossível a sua eliminação, já que o crescimento em biofilme confere resistência ao sistema imune e uma elevada resistência aos antibióticos (100). Por fim, obtêm-se colónias puntiformes, que conferem uma maior aderência à superfície das vias aéreas e uma maior resistência aos antibióticos (101).

O desenvolvimento rápido de *P. aeruginosa* pode estar relacionado com estirpes hipermutáveis, que apresentam elevados índices de mutações espontâneas, tendo um papel importante na adaptação e persistência no ambiente pulmonar (102).

A infecção por *P. aeruginosa* é considerado o fator que mais contribui para o declínio da função pulmonar e consequente mortalidade em doentes com FQ (103).

1.6.2 *Stenotrophomonas maltophilia*

É um patógeno oportunista, principalmente em meio hospitalar, estando associado a elevada mortalidade e morbidade (104), devido a um aumento significativo da resistência aos antibióticos de largo espectro (105). Tem surgido como uma bactéria emergente importante nos doentes com FQ (106) e, ao contrário da colonização por *P. aeruginosa* e Complexo *B. cepacia*, a infecção no trato respiratório por *S. maltophilia* tende a ser transitória e recorrente (97), tendo uma prevalência entre os 3% a 7% (107).

Embora não se conheça de forma clara a patogenicidade desta bactéria na FQ (108), julga-se que contribui significativamente para o processo inflamatório, levando à insuficiência respiratória e morte (104).

1.6.3 *Achromobacter xylosoxidans*

A prevalência desta bactéria é cada vez maior nos doentes com FQ e a sua prevalência atual varia entre 2% a 11%. A colonização é frequentemente transitória, contudo 2% dos pacientes têm infecções crônicas por *A. xylosoxidans* (109).

Ainda não se encontra esclarecido se a bactéria *A. xylosoxidans* causa algum efeito clínico nos pacientes com FQ ou se meramente coloniza o trato respiratório (110), no entanto alguns estudos têm demonstrado um impacto negativo na doença pulmonar (111).

1.6.4 Complexo *Burkholderia cepacia*

Este complexo bacteriano é composto por nove espécies diferentes estritamente relacionadas, mas distintas, e a maioria das infecções (85%) são causadas pelas espécies *B. multivorans* e *B. cenocepacia* (12). A taxa de incidência deste complexo nos doentes com FQ varia entre 7 a 13% (112).

A colonização do trato respiratório pelo Complexo *B. cepacia* produz vários tipos de evolução e a sua aquisição associa-se habitualmente a deterioração clínica e funcional. No entanto, ainda pouco se conhece sobre a evolução da doença pela sua colonização, visto que alguns doentes não têm qualquer agravamento, outros sofrem um agravamento progressivo com múltiplas agudizações e outros doentes apresentam uma deterioração progressiva, com evolução fulminante para pneumonia necrotizante que leva à morte (Síndrome cepacia) (12).

Em análises genotípicas, foi demonstrado que um único doente pode ter uma infeção simultânea com diversas espécies, o que impede de projetar medidas de controlo da infeção, podendo ainda dificultar os resultados clínicos (113).

1.7 Métodos de identificação

Os métodos para a identificação de bactérias na Microbiologia Clínica têm evoluído continuamente, havendo uma procura constante de técnicas e métodos que permitam otimizar a sua identificação. Assim, existem quatro diferentes gerações de tecnologias desenvolvidas ao longo do tempo e que permitem a identificação de bactérias (114) (figura 10):

- Primeira geração: a identificação é realizada através de testes fenotípicos que exploram as diferenças metabólicas entre as diferentes espécies, podendo demorar entre 24h a 48h (114).
- Segunda geração: consiste na adaptação das metodologias da primeira geração aos equipamentos automáticos. Existem diversos equipamentos nesta geração, sendo o VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) um deles. Este identifica 115 bactérias Gram positivo (GP) e 135 Gram negativo (GN) através de duas cartas de identificação (ID-GP – identificação de bactérias GP, e ID-GN – identificação de bactérias GN) que se baseiam em testes colorimétricos, em aproximadamente 10h (115).
- Terceira geração: baseia-se em testes moleculares, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) um dos métodos mais sensíveis. Esta metodologia permite a identificação de bactérias de crescimento lento ou não cultiváveis através da amplificação da região 16S do DNA ribossomal (rDNA), contudo é necessário extrair o ácido nucleico bacteriano, podendo demorar entre 24h a 36h (114).
- Quarta geração: utiliza a tecnologia MALDI-TOF MS, que é, atualmente, uma tecnologia promissora na identificação rápida de bactérias (114). A identificação é realizada através da análise proteica das bactérias por espectrometria de massa, demorando apenas alguns minutos (116). Um dos equipamentos que utiliza esta tecnologia é o VITEK® MS (bioMérieux), no qual a identificação é alcançada através da comparação entre o espectro proteico obtido com os espectros da base de dados do equipamento (114) em sensivelmente 15min (117).

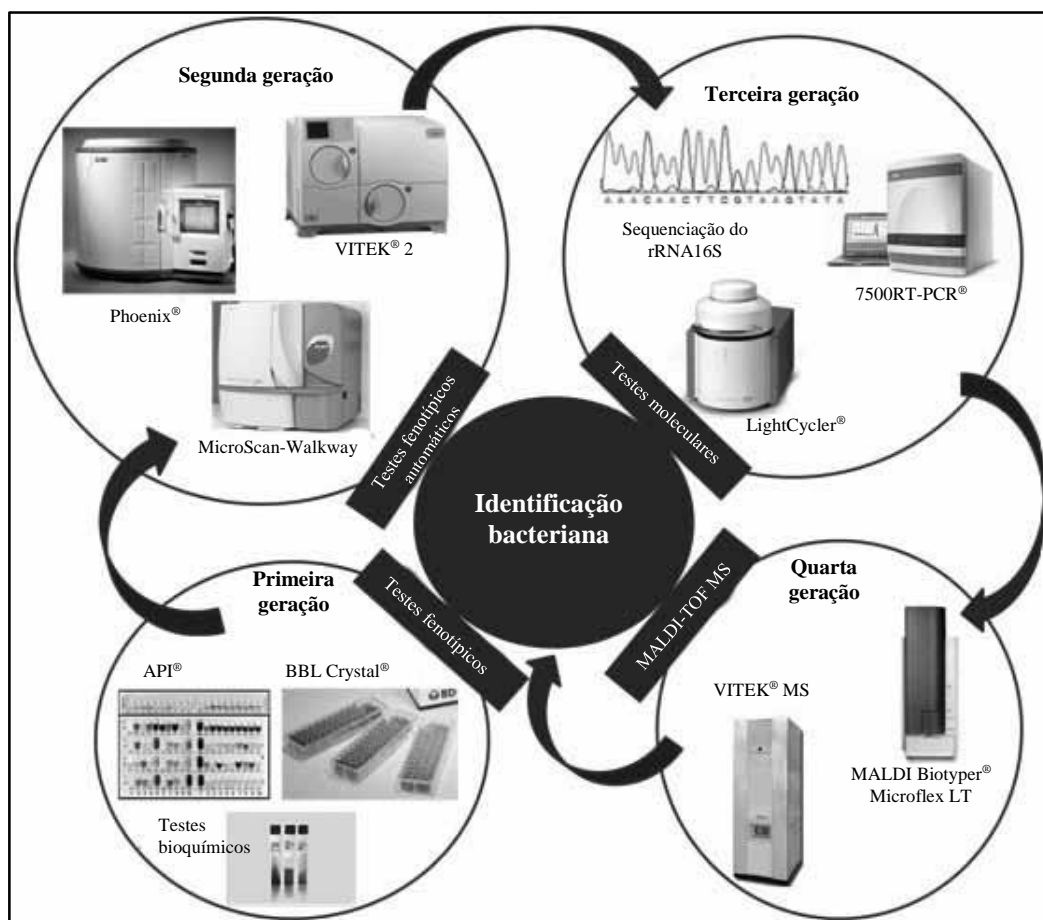


Figura 10: Evolução da identificação bacteriana (114)

1.7.1 MALDI-TOF MS

A MS é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado ou de diferentes compostos em misturas complexas, por meio da determinação da sua massa molecular na forma iónica, baseada na movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa do analito e da sua carga, designada por m/z (*mass-to-charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula e seus fragmentos, é possível deduzir qual a sua composição química e, com isso, determinar a sua estrutura (118).

A identificação rápida de microrganismos é de grande importância para a área de saúde humana e a MS é um método rápido e sensível para a identificação e tipificação desses microrganismos (119), tendo-se mostrado confiável na diferenciação de bactérias GN e GP, cianobactérias, fungos e protozoários em diferentes níveis taxonómicos (120).

Um espectrómetro de massa é composto por três módulos principais: fonte de iões (parte do espectrómetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja,

transformação de moléculas neutras em iões), analisador de massas (responsável pela separação dos iões de acordo com o seu m/z , através da aplicação de campos elétricos e magnéticos) e o detetor (detecção e amplificação dos iões) (121).

1.7.1.1 Fontes de ionização

A ionização é o processo onde ocorre a conversão de um átomo ou molécula num ião, funcionando de modo diferente dependendo se o ião formado é positivo (protonação) ou negativo (desprotonação). O processo de ionização é fundamental para a espetrometria, tendo sido desenvolvidas diversas fontes ao longo da história, como a tecnologia MALDI (122).

1.7.1.1.1 MALDI

Na ionização por MALDI a amostra deve ser misturada com uma matriz específica que, quando seca irá cristalizar-se com o analito, auxiliando na sua ionização. A transferência de energia por MALDI ocorre através da irradiação pulsada do laser, em que a matriz converte a energia do laser em energia para excitar o analito, promovendo sua ionização. Esta forma de transferência de energia é bastante eficiente na obtenção de moléculas intactas, uma vez que não sofrem incidência direta de energia do laser, o que poderia causar a sua decomposição. Este processo ocorre numa câmara de vácuo e os iões então formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador (123).

Existe uma grande variedade de matrizes que podem ser utilizadas, constituídas principalmente por compostos aromáticos. As fontes de laser também podem variar, contudo a mais comum é a de nitrogénio, com comprimento de onda de 337nm (124).

Embora existam diversas fontes de ionização, a técnica de MALDI apresenta diversas vantagens relativamente às outras técnicas de ionização, devido à sua sensibilidade, eficiência de ionização, capacidade de ionizar moléculas de alto peso molecular sem fragmentá-las e capacidade de analisar misturas complexas (122).

1.7.1.2 Analisadores de massas

Após a formação dos iões, estes são levados para dentro do espetrómetro, num ambiente de vácuo, e levados até ao detetor. O princípio da espetrometria de massa é a separação destes iões com base nas suas diferenças de m/z . Para isso, foram desenvolvidos diferentes analisadores de massas, como o analisador TOF (125).

1.7.1.2.1 TOF

São baseados no princípio de que os iões com a mesma carga têm energia cinética igual e a velocidade é inversamente proporcional à massa (126). Assim, se dois iões com a mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, as suas velocidades serão dependentes das suas massas, e alcançarão o detetor com “tempos de voo” diferentes. Assim, o ião de menor massa atingirá o detetor primeiro, enquanto o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detetor (127).

Para o funcionamento correto do TOF, é imprescindível que todos os iões formados na fonte entrem no analisador ao mesmo tempo, pois só assim será possível determinar o tempo que cada um levou para percorrer toda a extensão do analisador (128) e com o intuito de aumentar a distância percorrida pelos iões, foram adicionados refletores aos analisadores, permitindo aumentar a sua precisão (129).

1.7.1.3 Detetores

Os detetores compreendem a porção final dos espetrómetros de massas e a sua função é detetar os iões que chegam até eles e amplificar o sinal (118). Os detetores funcionam pela conversão dos feixes dos iões em sinais elétricos e estes podem ser armazenados e traduzidos em imagens (122).

1.7.1.4 Princípio da técnica

Numa primeira fase, a amostra é misturada com a matriz, normalmente um ácido orgânico com forte absorção de radiação ultravioleta (130), resultando na cristalização das moléculas da amostra e da matriz. Esta mistura é bombeada por um laser e a matriz absorve a energia do laser (131), transferindo-a para as moléculas da amostra resultando na dessorção e ionização suave das moléculas da amostra/matriz, formando uma “nuvem” de iões na fase

gasosa. Os íons são acelerados para um tubo TOF através da ação de um campo eletrostático e separados de acordo com o tempo de voo (132); a separação dos íons é realizada sob vácuo, de forma a evitar a colisão com as moléculas de ar (118). A dimensão dos íons é diretamente proporcional ao tempo de voo, que compreende o tempo decorrido entre o sinal inicial do laser e a detecção dos íons. Portanto, o tempo de voo necessário para os íons chegarem ao detetor depende da massa (m) e da carga (z) das proteínas. Como resultado é produzido um espectro (perfil) que associa a razão m/z e a intensidade do sinal e este perfil é comparado com uma base de dados, o que permite identificar a bactéria (128). Assim, a análise MALDI-TOF MS produz um perfil proteico único e característico de uma determinada bactéria (133) (figura 11).

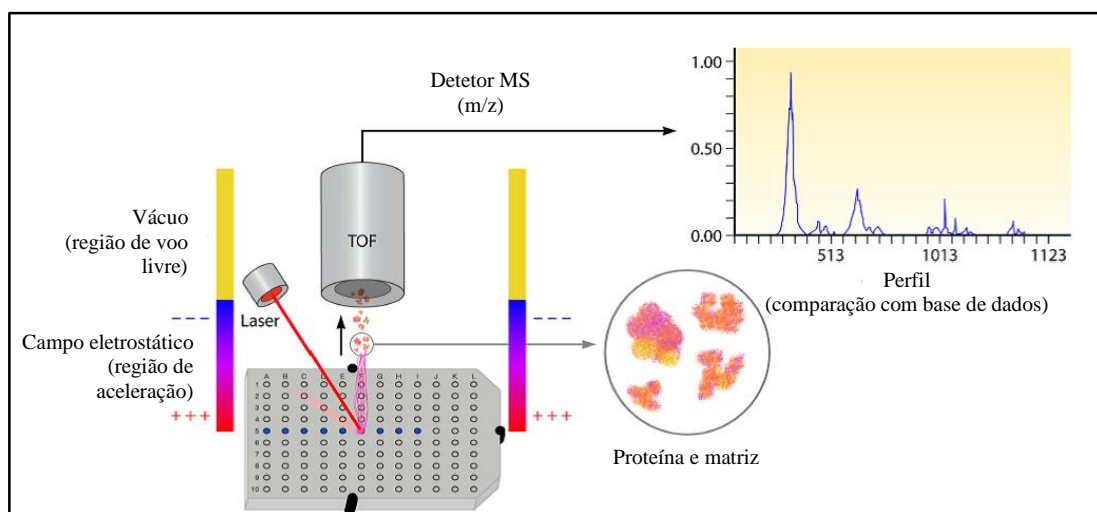


Figura 11: Esquema da análise de amostras microbiológicas por MALDI-TOF MS (128)

2 Justificação do tema e objetivos

2.1 Justificação do tema

O exame bacteriológico de amostras do trato respiratório em indivíduos com FQ é extremamente relevante para o conhecimento da população colonizadora de cada doente e para o tratamento das situações de infeção. O adequado tratamento das infeções nestes doentes é fundamental para uma boa evolução da doença, melhoria da qualidade de vida e perspetivas para um eventual transplante. Portanto, a exata identificação desses agentes patogénicos é fundamental para o tratamento da infeção, seja como orientação para o uso adequado de antibióticos ou na aplicação adequada de medidas de controlo.

2.2 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo comparar duas diferentes gerações de tecnologias de identificação bacteriana na rotina laboratorial, na identificação de BGNNF isolados em amostras de doentes com FQ.

2.2.1 Objetivo específico

Avaliar o impacto da introdução da tecnologia MALDI-TOF MS na rotina do Laboratório de Microbiologia do Hospital de São João, através do sistema VITEK® MS, na identificação dos BGNNF.

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais

Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro, Gelose Chocolate PolyViteX, Gelose MacConkey, Gelose Chapman 2, *E. coli* ATCC 8739, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e *slides* descartáveis para o VITEK[®] foram comprados a bioMérieux (Marcy l'Etoile, França).

3.2 Métodos

3.2.1 Amostras

Durante o período compreendido entre janeiro 2002 e agosto de 2014 (02 de janeiro de 2002 a 28 de fevereiro de 2013 para o VITEK[®] 2 e 01 de março de 2013 a 08 de agosto de 2014 para o VITEK[®] MS) foram estudadas 2850 amostras do trato respiratório (secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares) provenientes de 85 doentes diagnosticados com FQ, utilizando duas diferentes metodologias:

- Os resultados dos exames laboratoriais realizados entre 02 de janeiro de 2002 a 30 de setembro de 2013 foram recolhidos com o recurso ao programa informático de gestão laboratorial Clinidata[®]XXI (Maxdata, Carregado, Portugal).
- As amostras que chegaram ao Laboratório de Microbiologia do Hospital de São João entre 01 de outubro de 2013 a 08 de agosto de 2014, foram processadas de acordo com o protocolo existente nessa instituição.

3.2.2 Amostra – cultura e isolamento

Em cada amostra, foi selecionada a porção mais purulenta e/ou sanguínea da amostra e realizada a sementeira por esgotamento (secreções) ou quantitativa (lavados) em quatro diferentes meios:

- Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro: meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do seu metabolismo, sendo também um meio diferencial.
- Gelose Chocolate PolyViteX: meio de isolamento particularmente recomendado para o crescimento de estirpes fastidiosas.
- Gelose MacConkey: meio de isolamento seletivo para bacilos GN e diferencial.

- Gelose Chapman 2: meio que se destina ao isolamento seletivo de *Staphylococcus* spp. e diferencial para *S. aureus*.

Após a sementeira, as placas são incubadas em estufa a 37°C e, após 24h/48h, é verificado o crescimento bacteriano nos diferentes meios. Sempre que ocorre crescimento bacteriano, as amostras são identificadas com a utilização do equipamento VITEK® MS (bioMérieux).

3.2.3 Identificação – VITEK® MS

3.2.3.1 Preparação do *slide*

A preparação dos *slides* descartáveis (formato de lâmina de microscópio com 48 poços, dividido em três grupos de 16 poços e 1 poço de calibração – grupo de aquisição) foi realizada com recurso à Estação de Preparação VITEK® MS para conectar as informações da amostra com o VITEK® MS. Posteriormente, era inoculado 1µL de colónia bacteriana num poço do *slide* e de 1µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico, deixando secar à temperatura ambiente. Conforme o recomendado pelo fabricante (bioMérieux), era utilizado como calibrador e controlo a estirpe *E. coli* ATCC 8739, sendo inoculada no poço de calibração central do respetivo grupo de aquisição.

3.2.3.2 Obtenção dos espetros de massa

O espectrofotómetro de massa Shimadzu Axima® Assurance (bioMérieux) opera em conjunto com o *software* da Estação de Preparação VITEK® MS. A deteção é realizada em modo linear positivo com uma frequência do laser de 50 Hz e, para cada espetro, são realizados 100 perfis em diferentes posições da amostra.

3.2.3.3 Análise do espetro de massa

A identificação do microrganismo é baseada na comparação das características do espetro obtido (presença e ausência de picos específicos) com os espetros típicos de cada espécie existentes na base de dados do VITEK® MS.

3.2.3.4 Interpretação dos resultados

Quando ocorre uma combinação perfeita entre o espectro obtido e o espectro da base de dados, o sistema indica qual o microrganismo com uma probabilidade de 99,9% (“*Good ID*”).

Nas situações em que uma combinação perfeita não é obtida, mas na qual o espectro obtido é suficientemente próximo a um espectro de referência, o microrganismo é identificado com uma probabilidade 60% a 99,8% (“*Good ID*” >60-99,8%).

Se o perfil obtido possuir mais que uma correspondência, é dada uma lista de possíveis microrganismos (“*Low discrimination*”, <60%) ou, caso não exista correspondência com a base de dados, não é indicado qualquer resultado (“*No ID*”).

3.3 Análise dos resultados

Os dados obtidos para a realização deste trabalho foram analisados com o auxílio do *software* informático Excel® (Microsoft, Redmond, Estados Unidos da América), versão 2013. Esta análise permitiu observar a frequência dos diferentes géneros de BGNNF encontrados nos doentes com FQ, verificando-se o impacto da tecnologia MALDI-TOF MS na identificação desse grupo de bactérias.

3.4 Questões éticas

Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde e pelo Conselho de Administração do Centro Hospitalar de São João, EPE.

4 Resultados

Resultados

Foram estudadas 2850 amostras de um total de 85 doentes, 1623 (57%) da população adulta e 1227 (43%) na população pediátrica, no período de 02 de janeiro de 2002 a 08 de agosto de 2014. A distribuição dos pacientes quanto ao sexo foi de 49,2% do sexo masculino e 50,8% do sexo feminino; a distribuição das amostras quanto ao equipamento utilizado foi de 2342 (82,2%) para o VITEK® 2 e 508 (17,8%) para o VITEK® MS. Todas as bactérias identificadas e respetiva frequência em cada equipamento encontram-se na tabela 4.

Tabela 4: Bactérias isoladas e respetiva frequência no VITEK® 2 e VITEK® MS

Bactéria	Equipamento		Bactéria	Equipamento	
	VITEK® 2	VITEK® MS		VITEK® 2	VITEK® MS
<i>Achromobacter</i> spp.	61	36	<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	6
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	33	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	1	<i>Klebsiella</i> spp.	3	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2	1	<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	0
<i>Acinetobacter junii</i>	2	0	<i>Moraxella catarrhalis</i>	13	13
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	6	0	<i>Morganella morganii</i>	8	0
<i>Acinetobacter</i> spp.	2	0	<i>Neisseria cinerea</i>	1	0
<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i>	4	0	<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	5	0
BGNNI	38	0	<i>Pantoea</i> spp.	1	0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	531	93
<i>Burkholderia cepacia</i>	10	0	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13	3
<i>Burkholderia gladioli</i>	2	0	<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	4	2	<i>Pseudomonas putida</i>	7	2
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0	<i>Pseudomonas</i> spp.	4	0
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	120	11	<i>Ralstonia paucula</i>	2	0
Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	<i>Ralstonia pickettii</i>	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	<i>Raoultella planticola</i>	4	0
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	0	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	29	7	<i>Serratia liquefaciens</i>	0	1
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	0	<i>Serratia marcescens</i>	74	16
<i>Escherichia coli</i>	18	10	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0
Grupo <i>Serratia liquefaciens</i>	14	1	<i>Staphylococcus aureus</i>	849	229
<i>Haemophilus influenzae</i>	214	34	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	147	24
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0	1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	69	4
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3	2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	0

4.1 Desempenho global do VITEK® 2 e VITEK® MS

Os BGNNF foram isolados em 1175 amostras (41,2%), distribuídos por 1000 (85,1%) no VITEK® 2 e 175 (14,9%) no VITEK® MS. A percentagem e respetiva frequência, para ambos os equipamentos, quando ocorreu identificação ao nível do género, complexo e espécie ou quando não foram identificados os microrganismos encontra-se na figura 12.

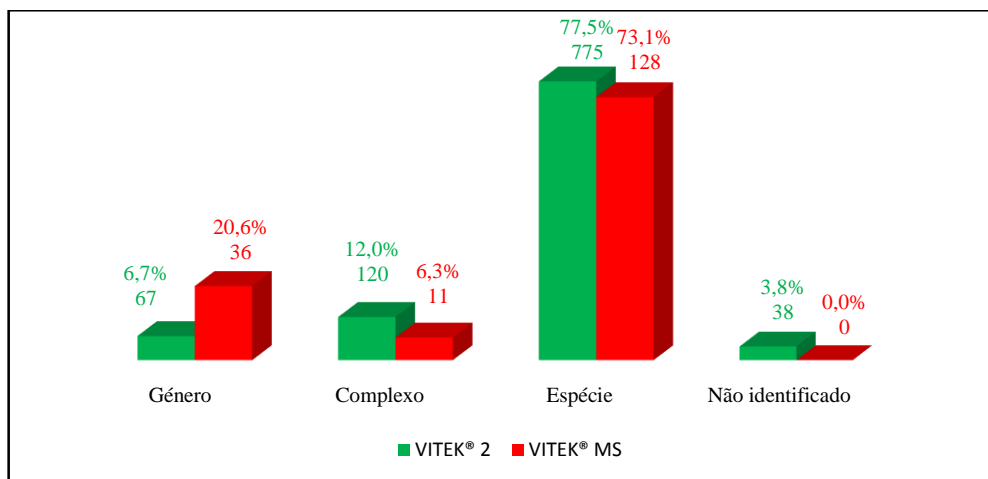


Figura 12: Percentagem e respetiva frequência da identificação dos diferentes equipamentos ao nível do género, complexo e da espécie e de isolamentos não identificados

Os resultados relativos à frequência e percentagem dos géneros identificados pelos aparelhos VITEK® 2 e VITEK® MS encontram-se representados na figura 13.

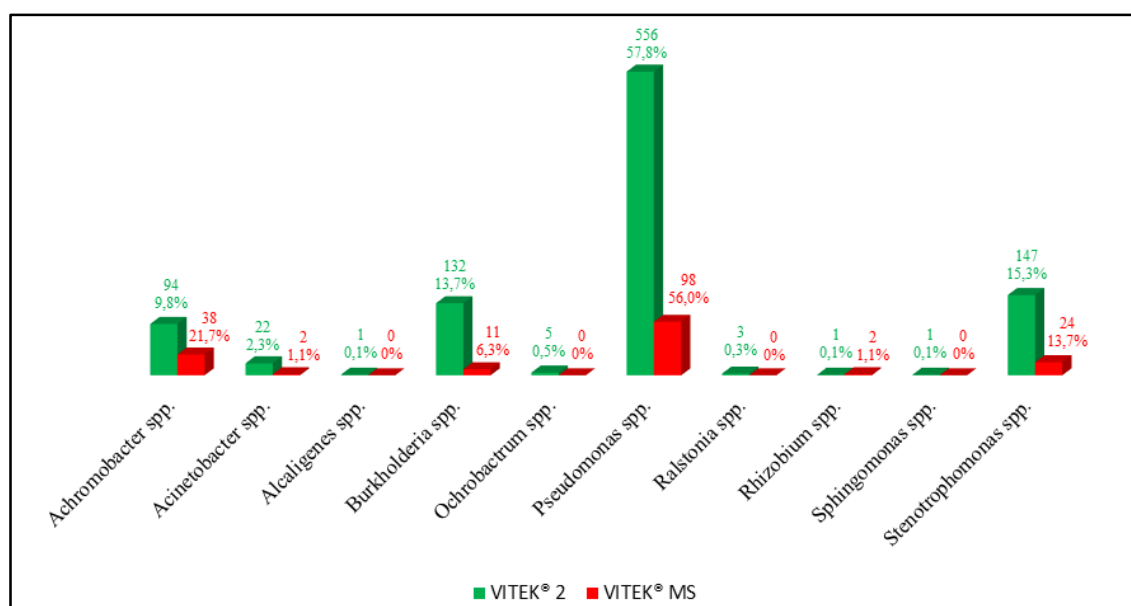
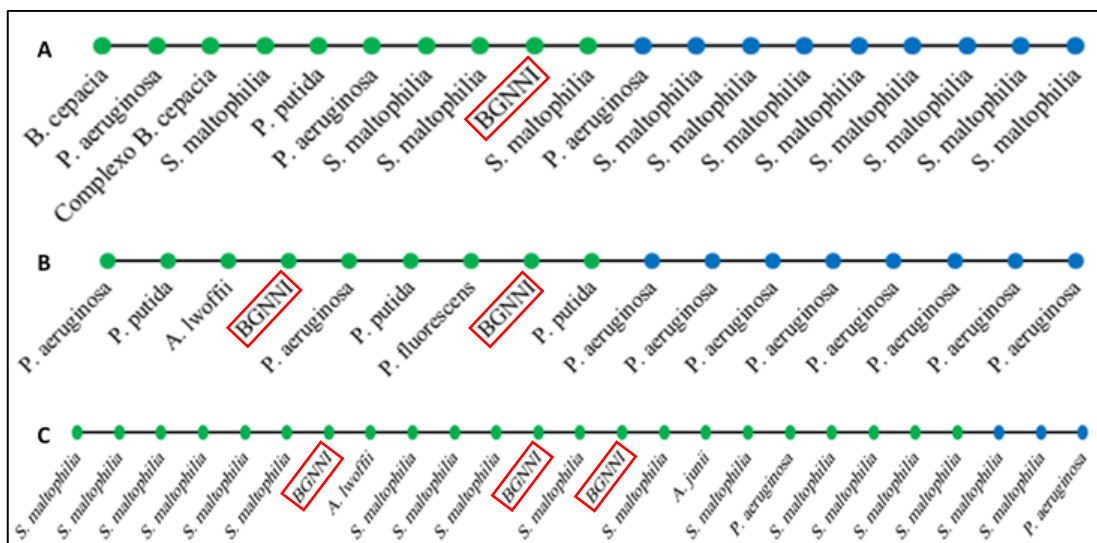
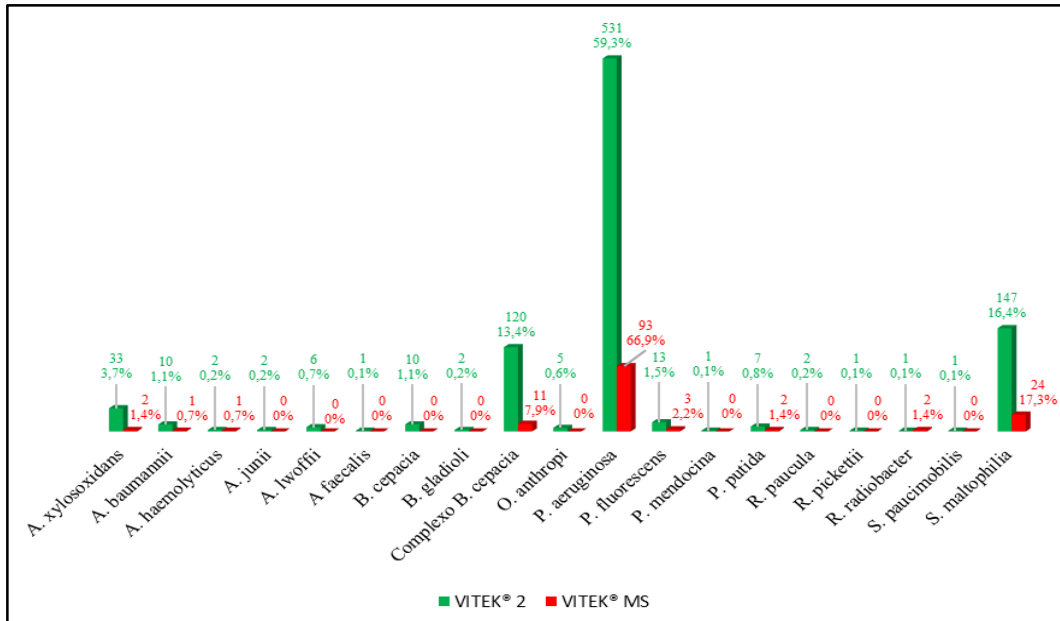


Figura 13: Frequência e respetiva percentagem dos diferentes géneros nos diferentes equipamentos



5 Discussão

Discussão

A cultura, isolamento e identificação dos microrganismos permanece como o *gold standard* no diagnóstico microbiológico. No entanto, o crescimento dos patogênicos exigentes pode ser demorado e os custos associados podem ser elevados. Uma das tecnologias de identificação bacteriana que mais se tem desenvolvido nos últimos anos é a MALDI-TOF MS (134).

Neste estudo propôs-se avaliar o impacto da introdução da tecnologia MALDI-TOF MS na rotina do Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar de São João, EPE na identificação de BGNNF. A identificação deste grupo de microrganismos é importante nos doentes com FQ, pois estão associados a uma deterioração da função pulmonar e, por isso, a sua correta identificação é importante para um tratamento adequado.

No total, foram realizadas 1175 identificações, obtendo-se 18 espécies e 1 complexo em 10 diferentes géneros. Nas 1000 amostras do VITEK[®] 2, este não forneceu identificação em 3,8% das situações e nos restantes 96,2% forneceu uma identificação ao nível do género em 6,7% das vezes, 12% ao nível do complexo e 77,5% ao nível da espécie, enquanto o VITEK[®] MS nas 175 identificações realizadas, forneceu sempre uma identificação, quer ao nível do género em 20,6%, quer ao nível do complexo em 6,3% e quer ao nível da espécie em 73,1%.

Dos BGNNF identificados, os géneros que apresentaram maior incidência foram a *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Burkholderia* spp. e *Achromobacter* spp., com uma frequência de 556, 147, 132 e 94 no VITEK[®] 2 e 98, 24, 11 e 38 no VITEK[®] MS, respetivamente. Dentro destes géneros, destacou-se a frequência de *P. aeruginosa* (531 no VITEK[®] 2 e 93 no VITEK[®] MS), *S. maltophilia* (147 no VITEK[®] 2 e 24 no VITEK[®] MS) e Complexo *B. cepacia* (120 no VITEK[®] 2 e 11 no VITEK[®] MS). A predominância destes BGNNF encontra-se de acordo com a teórica existente, que indica que a incidência dos BGNNF aumenta ao longo da idade do paciente, com destaque para a colonização de *P. aeruginosa* e devido a posterior tratamento antimicrobiano e deterioração pulmonar, surgem com maior frequência estirpes de *S. maltophilia*, *Achromobacter* spp. e *B. cepacia* (93).

Na identificação dos BGNNF ao nível da espécie, verificou-se uma dificuldade maior na identificação das estirpes de *Achromobacter* spp. e *Burkholderia* spp. em ambos os equipamentos.

O género *Achromobacter* foi identificado 94 vezes no VITEK[®] 2, tendo-se obtido uma identificação ao nível da espécie em 33 vezes (35,1%) e em 61 (64,9%) ao nível do género. Esta dificuldade verificada está de acordo com estudos realizados anteriormente, onde nos estudos realizados por Wallet *et al* e Bosshard *et al*, a capacidade do VITEK[®] 2 em identificar espécies de *Achromobacter* spp. foi nula ou muito baixa (135,136). Relativamente ao VITEK[®] MS, este género foi identificado em 38 situações, onde em 2 situações (5,3%) a identificação foi realizada ao nível da espécie e 36 (94,7%) ao nível do género. Esta elevada percentagem de identificações ao nível do género é devido à incapacidade do equipamento em diferenciar as espécies *A. denitrificans* e *A. xylosoxidans*, algo já verificado nos estudos de Bizzini *et al*, Dubois *et al* e Manji *et al*, onde as amostras foram sempre identificadas como *Achromobacter* spp. (138–140).

Burkholderia spp. foi identificada em 132 vezes no equipamento VITEK[®] 2, 12 (9,1%) ao nível da espécie e 120 (90,9%) ao nível do complexo. Estes resultados vão de encontro ao estudo de Brisse *et al* que demonstrou uma limitação do VITEK[®] 2 na identificação das espécies do complexo (137). Em relação ao VITEK[®] MS, foi identificada em 11 situações, sempre ao nível do complexo. Ao ser comparada a capacidade de identificação das espécies do Complexo *B. cepacia* obtida neste estudo com outros, verifica-se que existiu uma maior dificuldade na identificação ao nível da espécie. Num estudo realizado por Alby *et al*, aproximadamente 80% das estipes foram identificadas ao nível da espécie (141). Noutro estudo, realizado por Manji *et al*, a capacidade de identificação da espécie dependia da espécie em questão: identificação de todas as espécies de *B. multivorans* e nenhuma de *B. stabilis* (140). No estudo de Lambiase *et al* todas as espécies do género *Burkholderia* foram identificadas, inclusive as espécies do Complexo *B. cepacia* (142).

O equipamento VITEK[®] 2 teve, ainda, algumas falhas na identificação de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.. O género *Acinetobacter* foi identificado 22 vezes, onde 20 (90,9%) foi ao nível da espécie e 2 (9,1%) ao nível do género; sobre *Pseudomonas* spp. foi identificada 556 vezes, 552 (99,3%) ao nível da espécie e 4 (0,7%) ao nível do género. Estes lapsos na identificação destes dois géneros são comprovados pelas pesquisas realizadas por Wallet *et al*, Otto-Karg *et al* e Funke *et al*, onde a distinção das espécies de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. tiveram algumas falhas (135,143,144).

A excelente discriminação até ao nível da espécie nos restantes géneros visualizada neste estudo é concordante com trabalhos anteriores. A capacidade do equipamento VITEK[®]

2 em identificar as espécies de *Alcaligenes* spp., *Ochrobactrum* spp. *Ralstonia* spp., *Rhizobium* spp., *Sphingomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. foi observada por Wallet *et al* e Otto-Karg *et al* onde foi evidenciada uma excelente identificação ao nível da espécie (135,143); tal como a capacidade do equipamento VITEK® MS em discriminar as espécies de *Pseudomonas* spp. foi verificada no estudo de Wang *et al* – boa identificação das espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida* (134), tal como na identificação das espécies de *Acinetobacter* spp., *Rhizobium* spp. e *Stenotrophomonas* spp. foi demonstrada pelo estudo de Manji *et al* – excelente capacidade em identificar as espécies *R. radiobacter*, *S. maltophilia* e *Acinetobacter* spp. (140).

Sobre o impacto da tecnologia MALDI-TOF MS na identificação dos BGNNF em doentes com FQ do Centro Hospitalar de São João, EPE, este pode ser verificado através da análise de 3 doentes.

No paciente A, nas 10 amostras analisadas, o VITEK® 2 identificou os BGNNF ao nível da espécie em 8 vezes (80%), ao nível do complexo em 1 amostra (10%) e não realizou nenhuma identificação na restante amostra (10%); o VITEK® MS foi utilizado em 9 amostras, realizando uma identificação ao nível da espécie em todas as amostras.

No paciente B, o VITEK® 2 foi utilizado na análise de 9 amostras, tendo realizado uma identificação ao nível da espécie em 7 (77,8%) e não identificou nas outras 2 (22,2%) amostras. O VITEK® MS foi utilizado em 8 amostras, alcançando em todas uma identificação ao nível da espécie.

No paciente C, o VITEK® 2 identificou a espécie em 19 amostras (86,4%) e falhou a identificação em 3 (13,6%) num total de 22 amostras analisadas. O VITEK® MS identificou ao nível da espécie nas 3 amostras analisadas.

Ao analisar estes três doentes, verifica-se que a introdução do equipamento VITEK® MS levou à melhoria da identificação em cada doente através do reconhecimento da bactéria colonizadora, pelo menos, até ao nível do género. Esta situação nem sempre se verificava com o equipamento VITEK® 2, onde em diversas situações não se identificou o género da bactéria.

6 Conclusões, limitações e sugestões

6.1 Conclusões

Com base nos resultados obtidos nos dois equipamentos, é possível concluir que:

- O equipamento VITEK® 2 tem sido o equipamento mais utilizado nos últimos anos na rotina laboratorial e, apesar da boa capacidade em identificar os BGNNF, este possui falhas nessa identificação. Neste trabalho, verificou-se que em 1000 isolamentos de BGNNF, identificou ao nível da espécie em 77,5% das vezes, 12% ao nível do complexo e ao nível do género em 6,7% das vezes, não tendo fornecido uma identificação em 3,8% das ocasiões.
- O VITEK® 2 teve dificuldade na identificação ao nível da espécie em quatro géneros distintos: *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp. e *Pseudomonas* spp..
- O equipamento VITEK® MS permitiu identificar todos os isolados até ao género, onde num total de 175 isolamentos, identificou ao nível da espécie em 73,1% das situações, ao nível do complexo em 6,3% e em 20,6% das vezes ao nível do género.
- O VITEK® MS apresentou dificuldade em distinguir as espécies de apenas dois géneros: *Achromobacter* spp. e *Burkholderia* spp.. Esta dificuldade pode dever-se à incapacidade do MALDI-TOF MS em discriminar espetros de espécies estritamente relacionadas, como as espécies *A. denitrificans* e *A. xylosoxidans* e as espécies pertencentes ao Complexo *B. cepacia*.

Perante os resultados verifica-se que a introdução da tecnologia MALDI-TOF MS na rotina laboratorial desde março de 2013 melhorou a identificação dos BGNNF em doentes com FQ, dado que todas as identificações foram realizadas pelo menos até ao género.

Assim, a introdução da tecnologia MALDI-TOF MS, através do equipamento VITEK® MS, tornou mais eficaz a identificação bacteriana, tendo ainda a vantagem de fornecer essa identificação em apenas alguns minutos através de uma pequena quantidade de inóculo, comparando com o equipamento VITEK® 2, o que permite uma melhoria de resposta em, aproximadamente, 24h. Devido a esta rápida identificação do agente patogénico, é possível realizar uma terapêutica mais direcionada, permitindo uma maior eficácia no tratamento.

Contudo, é necessário melhorar a base de dados para alguns géneros de BGNF, de forma a possibilitar uma identificação mais eficaz de todas as espécies.

6.2 Limitações

Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente ao nível da quantidade de amostras do equipamento VITEK® MS relativamente ao VITEK® 2, havendo uma grande diferença nos resultados globais obtidos.

Uma outra limitação está relacionada com a análise individual dos doentes. Devido ao curto espaço de tempo de utilização do equipamento VITEK® MS, alguns doentes não tiveram identificações realizadas por este equipamento, não sendo, por isso, possível realizar uma análise do seu impacto em todos os doentes.

6.3 Sugestões

Dado que este é um estudo pioneiro em Portugal sobre o impacto da tecnologia MALDI-TOF MS na identificação bacteriana em rotina hospitalar, este poderá ser utilizado futuramente para avaliar o impacto da melhoria constante das bases de dados do equipamento.

7 Bibliografia

Bibliografia

1. Staab D. Cystic fibrosis - therapeutic challenge in cystic fibrosis children. *Eur J Endocrinol*. 2004;151 Supl 1:S77–S80.
2. Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(7):593–597.
3. Reis FJC, Damaceno N. Fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)*. 1998;74(Supl 1):S76–S94.
4. Damas C, Amorim A, Gomes I. Fibrose quística: Revisão. *Rev Port Pneumol*. 2008;XIV(1):89–112.
5. Quinton PM. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:212–225.
6. Mattar AC V, Gomes EN, Adde F V, Leone C, Rodrigues JC. Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(2):109–114.
7. Lindau-Shepard BA, Pass KA. Newborn screening for cystic fibrosis by use of a multiplex immunoassay. *Clin Chem*. 2010;56(3):445–450.
8. Collazo T, López I, Clark Y, Piloto Y, González L, Gómez M, García M, Reyes L, Rodríguez F. Antenatal testing for cystic fibrosis in Cuba, 1988-2011. *MEDICC Review*. 2014;16(3-4):18–21.
9. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(5):475–482.
10. Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med*. 2001;3(2):149–154.

11. Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, Palomaki GE, Popovich BW, Pratt VM, Rohlfes EM, Strom CM, Richards CS, Witt DR, Grody WW. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med*. 2004;6(5):387–391.
12. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):29–70.
13. Zhou J, Garber E, Desai M, Saiman L. Compliance of clinical microbiology laboratories in the United States with current recommendations for processing respiratory tract specimens from patients with cystic. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1547–1549.
14. Lutz L, De-Paris F, Vieira MI, Marques EA, Barth AL. Bacteriologia da fibrose cística. *rev HCPA*. 2011;31(2):168–184.
15. van Belkum A, Durand G, Peyret M, Chatellier S, Zambardi G, Schrenzel J, Shortridge D, Engelhardt A, Dunne WM. Rapid clinical bacteriology and its future impact. *Ann Lab Med*. 2013;33(1):14–27.
16. Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schlüter H, Wolters M, Aepfelbacher M, Hentschke M. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *PloS one*. 2014;9(7):1–11.
17. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380–407.
18. Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CAD, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Rychert JA, Westblade LF, Procop GW. Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(12):1571–1578.

19. Zhou M, Veenstra TD. Mass spectrometry: m/z 1983-2008. *BioTechniques*. 2008;44(5):667–670.
20. Duncan MW, Roder H, Hunsucker SW. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2008;7(5):355–370.
21. Mano N, Goto J. Biomedical and biological mass spectrometry. *Anal Sci*. 2003;19(1):3–14.
22. Cobo F. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical virology: a review. *Open Virol J*. 2013;7:84–90.
23. GPnotebook. Diagram of inheritance pattern of an autosomal recessive condition e.g. sickle cell disease, thalassaemia, cystic fibrosis [Internet]. Disponível em: <http://www.gpnotebook.co.uk/simplepage.cfm?ID=x20100330130553261069>
24. Guillot L, Beucher J, Tabary O, Rouzic PL, Clement A, Corvol H. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:83–93.
25. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:94–102.
26. Gene Gateway: exploring genes and genetic disorders. A Web Companion to the Human Genome Landmarks Poster [Internet]. Disponível em: <http://web.ornl.gov/>.
27. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen H V, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014;13(4):403–409.
28. Den Dunnen J, Antonarakis S. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*. 2001;109(1):121–124.
29. Patrick AE, Thomas PJ. Development of CFTR structure. *Front Pharmacol*. 2012;3(162):1–11.

30. Dorwart M, Thibodeau P, Thomas P. Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cyst Fibros*. 2004;3(Suppl 2):91–94.
31. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2013;22(127):58–65.
32. Linsdell P. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel blockers: pharmacological, biophysical and physiological relevance. *World J Biol Chem*. 2014;5(1):26–39.
33. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev*. 2005;26(4):135–153.
34. Oxford University Gene Medicine. CFTR Protein Structure [Internet]. Disponível em: <http://users.ox.ac.uk/~genemed/cysticfibrosis/protein.html>.
35. Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JW. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol*. 1998;274(5 Pt 1):C1397–C1410.
36. Bonadia LC, Marson FAL, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene*. 2014;540(2):183–190.
37. Quintana-Gallego E, Delgado-Pecellín I, Acuña CC. CFTR protein repair therapy in cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol*. 2014;50(4):146–150.
38. Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:267–282.
39. Thursfield RM, Davies JC. Cystic fibrosis: therapies targeting specific gene defects. *Paediatr Respir Rev*. 2012;13(4):215–219.
40. Wang Y, Wrennall JA, Cai Z, Li H, Sheppard DN. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: from single molecules to animal models. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:47–57.

41. Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J*. 2007;406(2):257–263.
42. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*. 2011;139(6):1480–1490.
43. Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:15–25.
44. Moskowitz SM, Gibson RL, Effmann EL. Cystic fibrosis lung disease: genetic influences, microbial interactions, and radiological assessment. *Pediatr Radiol*. 2005;35(8):739–757.
45. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000 janeiro;67(2):117–133.
46. Mendes F, Rosa MR, Dragomir A, Farinha CM, Roomans GM, Amaral MD, Penque D. Unusually common cystic fibrosis mutation in Portugal encodes a misprocessed protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(3):665–671.
47. Haack A, Aragão GG, Novaes MRCG. Pathophysiology of cystic fibrosis and drugs used in associated digestive tract diseases. *World J Gastroenterol*. 2013;19(46):8552–8561.
48. O’Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373:1891–1904.
49. Brown MB, Haack KK V, Pollack BP, Millard-Stafford M, McCarty N. Low abundance of sweat duct Cl⁻ channel CFTR in both healthy and cystic fibrosis athletes with exceptionally salty sweat during exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(3):R605–R615.
50. Bilton D. Cystic fibrosis. *Medicine*. 2008;36(5):273–278.

51. Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, Cutting GR. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med*. 2008;10(12):851–868.
52. Rodríguez M, González A. Afectación respiratoria en el niño. Em: *Monografías NeumoMadrid*. Madrid: Ergon; 2005. p. 79–90.
53. Reid DW, Withers NJ, Francis L, Wilson JW, Kotsimbos TC. Iron deficiency in cystic fibrosis: relationship to lung disease severity and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Chest*. 2002;121(1):48–54.
54. Sánchez MCP, Carrera LG, Navarro IF. Afectación respiratoria en el adulto. Em: *Monografías NeumoMadrid*. Madrid: Ergon; 2005. p. 91–98.
55. Flume PA, Mogayzel PJ, Robinson KA, Rosenblatt RL, Quittell L, Marshall BC. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: pulmonary complications: hemoptysis and pneumothorax. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(3):298–306.
56. Rodríguez L, Cervantes E, Ortiz R. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: a public health problem. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(4):1174–1205.
57. Ooi CY, Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *J Cyst Fibros*. 2012;11(5):355–362.
58. Trapnell BC, Maguiness K, Graff GR, Boyd D, Beckmann K, Caras S. Efficacy and safety of Creon 24,000 in subjects with exocrine pancreatic insufficiency due to cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009;8(6):370–377.
59. Graff GR, Maguiness K, McNamara J, Morton R, Boyd D, Beckmann K, Bennett D. Efficacy and tolerability of a new formulation of pancrelipase delayed-release capsules in children aged 7 to 11 years with exocrine pancreatic insufficiency and cystic fibrosis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, two-period cross. *Clin Ther*. 2010;32(1):89–103.

60. Löhr J-M, Oliver MR, Frulloni L. Synopsis of recent guidelines on pancreatic exocrine insufficiency. *UEG Journal*. 2013;1(2):79–83.
61. Scheuing N, Holl RW, Dockter G, Fink K, Junge S, Naehrlich L, Smaczny C, Staab D, Thalhammer G, van Koningsbruggen-Rietschel S, Ballmann M. Diabetes in cystic fibrosis: multicenter screening results based on current guidelines. *PloS one*. 2013;8(12):1–9.
62. Parisi GF, Dio GD, Franzonello C, Gennaro A, Rotolo N, Lionetti E, Leonardi S. Liver disease in cystic fibrosis: an update. *Hepat Mon*. 2013;13(8):1–8.
63. Debray D, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C. Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros*. 2011;10(Suppl 2):S29–S36.
64. Chan HC, Ruan YC, He Q, Chen MH, Chen H, Xu WM, Chen WY, Xie C, Zhang XH, Zhou Z. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J physiol*. 2009;587(10):2187–2195.
65. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue L, Claustres M, Nunes V, Férec C, Estivill X. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*. 1995;332(22):1475–1480.
66. Morea A, Cameran M, Rebuffi AG, Marzenta D, Marangon O, Picci L, Zacchello F, Scarpa M. Gender-sensitive association of CFTR gene mutations and 5T allele emerging from a large survey on infertility. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(8):607–614.
67. Radpour R, Gourabi H, Dizaj A V, Holzgreve W, Zhong XY. Genetic investigations of CFTR mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as a cause of infertility. *J Androl*. 2008;29(5):506–513.
68. Gilljam M, Antoniou M, Shin J, Dupuis A, Corey M, Tullis DE. Pregnancy in cystic fibrosis. Fetal and maternal outcome. *Chest*. 2000;118(1):85–91.

69. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest*. 2004;125(Supl 1):S1–S39.
70. Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Dodd ME, Musson H, Niven RM, Economou G, Horrocks AW, Freemont AJ, Mawer EB, Adams JE. Low bone mineral density in adults with cystic fibrosis. *Thorax*. 1999;54(11):961–967.
71. King SJ, Topliss DJ, Kotsimbos T, Nyulasi IB, Bailey M, Ebeling PR, Wilson JW. Reduced bone density in cystic fibrosis: $\Delta F508$ mutation is an independent risk factor. *Eur Respi J*. 2005;25(1):54–61.
72. Voter KZ, Ren CL. Diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35(3):100–106.
73. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627–635.
74. Nelson MR, Adamski CR, Tluczek A. Clinical practices for intermediate sweat tests following abnormal cystic fibrosis newborn screens. *J Cyst Fibros*. 2011;10(6):460–465.
75. Farahmand F, Sadjadei N, Haghi-Ashtiani MT, Modaresi V, Rezaei N, Pakseresht B. Comparison of classic sweat test and crystallization test in diagnosis of cystic fibrosis. *Iran J Pediatr*. 2012;22(1):102–106.
76. Wang L, Freedman SD. Laboratory tests for the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(Supl 1):S109–S115.
77. Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem*. 2007;53(11):1891–1898.
78. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr*. 1998;132(4):589–595.

79. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Update on carrier screening for cystic fibrosis. ACOG. 2005;(486):1–4.
80. Domingo-Ribas C, Bosque-García M. Nasal potential difference test to diagnose cystic fibrosis. Arch Bronconeumol. 2006;42(1):33–38.
81. Dalcin PTR, Silva FAA. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. J Bras Pneumol. 2008;34(2):107–117.
82. Wilson RD. Cystic fibrosis carrier testing in pregnancy in Canada. J Obstet Gynaecol Can. 2002;24(8):644–647.
83. Ross LF, Saal HM, David KL, Anderson RR. Technical report: ethical and policy issues in genetic testing and screening of children. Genet Med. 2013;15(3):234–245.
84. Rock MJ, Levy H, Zaleski C, Farrell PM. Factors accounting for a missed diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening. Pediatr Pulmonol. 2011;46(12):1166–1174.
85. Sontag MK, Corey M, Hokanson JE, Marshall JA, Sommer SS, Zerbe GO, Accurso FJ. Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. J Pediatr. 2006;149(5):650–657.
86. Cotten SW, Bender LM, Willis MS. Multiple positive sweat chloride tests in an infant asymptomatic for cystic fibrosis. Lab Medicine. 2012;43(2):1–5.
87. Afonso JL, Tambascio J, Souza HCD, Jardim JR, Baddini Martinez JAB, Gastaldi AC. Transporte de secreções mucóides de indivíduos saudáveis e pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica e bronquiectasias. Rev Port Pneumol. 2013;19(5):211–216.
88. Reeves EP, Molloy K, Pohl K, McElvaney NG. Hypertonic saline in treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. ScientificWorldJournal. 2012;2012:1–11.
89. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet. 2003;361:681–689.

90. Wat D. Impact of respiratory viral infections on cystic fibrosis. *Postgrad Med J*. 2003;79(930):201–203.
91. McCaffery K, Olver RE, Franklin M, Mukhopadhyay S. Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Thorax*. 1999;54(5):380–383.
92. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):194–222.
93. Cantón R. Microbiología de la infección/colonización pulmonar en el paciente con fibrosis quística. Em: Cantón R, Baquero F, editores. Formación continuada en fibrosis quística: microbiología y antimicrobianos – Microbiología, infección/colonización pulmonar y fibrosis quística. Madrid: Adalia farma, SL; 2004. p. 11–28.
94. Stevens DA, Moss RRB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis - state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003;37(Supl 3):S225–S264.
95. Oliver A, Maiz L, Cantón R, Escobar H, Baquero F, Gómez-Mampaso E. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1298–1303.
96. Qin X. Chronic pulmonary pseudomonal infection in patients with cystic fibrosis: a model for early phase symbiotic evolution. *Crit Rev Microbiol*. 2014;1–14.
97. LiPuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(2):299–323.
98. Zemanick ET, Emerson J, Thompson V, McNamara S, Morgan W, Gibson RL, Rosenfeld M. Clinical outcomes after initial *Pseudomonas* acquisition in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2014;1–7.

99. Rogers GB, Hoffman LR, Whiteley M, Daniels TW V, Carroll MP, Bruce KD. Revealing the dynamics of polymicrobial infections: implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol.* 2010;18(8):357–364.
100. Ryall B, Carrara M, Zlosnik JEA, Behrends V, Lee X, Wong Z, Loughheed KE, Williams HD. The mucoid switch in *Pseudomonas aeruginosa* represses quorum sensing systems and leads to complex changes to stationary phase virulence factor regulation. *PloS one.* 2014;9(5):1–11.
101. Haussler S. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol.* 2003;52(4):295–301.
102. Marques EA. Perfil microbiológico na fibrose cística. *Revista HUPE.* 2011;10(4):23–35.
103. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PloS one.* 2013;8(4):1–10.
104. Pompilio A, Ciavardelli D, Crocetta V, Consalvo A, Zappacosta R, Ilio CD, Bonaventura GD. *Stenotrophomonas maltophilia* virulence and specific variations in trace elements during acute lung infection: implications in cystic fibrosis. *PloS one.* 2014;9(2):1–17.
105. Goss CH, Otto K, Aitken ML, Rubenfeld GD. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(3):356–361.
106. Vidigal PG, Dittmer S, Steinmann E, Buer J, Rath P-M, Steinmann J. Adaptation of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: molecular diversity, mutation frequency and antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(5-6):613–619.
107. Elborn JS. Identification and management of unusual pathogens in cystic fibrosis. *J R Soc Med.* 2008;101(Supl 1):S2–S5.

108. Goss C, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubenfeld GD, Ramsey BW. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004;59(11):955–959.
109. Trancassini M, Iebba V, Citerà N, Tuccio V, Magni A, Varesi P, Biase RVD, Totino V, Santangelo F, Gagliardi A, Schippa S. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Front Microbiol*. 2014;5(138):1–8.
110. Saiman L, Chen Y, Tabibi S, Gabriel PS, Zhou J, Liu Z, Lai L, Whittier S. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3942–3945.
111. Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Høiby N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2010;9(1):51–58.
112. Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha M V, Sá-Correia I, Barreto C. Infecção respiratória por bactérias do complexo cepacia: evolução clínica em doentes com fibrose quística. *Rev Port Pneumol*. 2008;XIV(1):5–26.
113. Bernhardt SA, Spilker T. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin Infect Dis*. 2003;37(6):780–785.
114. Santos AF, Cayô R, Schandert L, Gales AC. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. *J Bras Patol Med Lab*. 2013;49(3):191–197.
115. Chatzigeorgiou KS, Sergeantanis TN, Tsiodras S, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: a comprehensive meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3284–3291.

116. Rychert J, Burnham C-AD, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Procop GW, Richter SS, Sercia L, Westblade LF, Ferraro MJ, Brandaa JA. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2225–2231.
117. Machen A, Drake T, Wang YFW. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF Vitek mass spectrometry and the Vitek2 system. *PloS one.* 2014;9(2):1–7.
118. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2006;4(4):295–320.
119. Wang YFW, Fu J. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Thorac Dis.* 2014;6(5):507–511.
120. Dickinson DN, La Duc MT, Haskins WE, Gornushkin I, Winefordner JD, Powell DH, Venkateswaran K. Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry-based protein profiling. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(1):475–482.
121. Pavlovic M, Huber I, Konrad R, Busch U. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *Open Microbiol J.* 2013;7:135–141.
122. Siuzdak G. An introduction to mass spectrometry ionization: an excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *J Assoc Lab Autom.* 2004;9(2):50–63.
123. Jagtap RN, Ambre AH. Overview literature on matrix assisted laser desorption ionization mass spectroscopy (MALDI MS): basics and its applications in characterizing polymeric materials. *Bull Mater Sci.* 2005;28(6):515–528.
124. Busch KL. Desorption ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1995;30:233–240.

125. Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, Putignani L. The role of mass spectrometry in the “omics” era. *Curr Org Chem*. 2013;17(23):2891–2905.
126. Weickhardt C, Moritz F, Grotemeyer J. Time-of-flight Mass Spectrometry: state-of-art in chemical anlysis and molecular science. *Mass Spectrom Rev*. 1996;15:139–162.
127. Guilhaus M. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1995;30:1519–1532.
128. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Ver*. 2013;26(3):547–603.
129. Cornish TJ, Cotter RJ. Tandem time-of-flight mass spectrometer. *Analytical chemistry*. 1993;65(8):1043–1047.
130. Moore JL, Caprioli RM, Skaar EP. Advanced mass spectrometry technologies for the study of microbial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2014;19:45–51.
131. Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem*. 2006;52(7):1223–1237.
132. Graham RLJ, Graham C, McMullan G. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microb Cell Fact*. 2007;6(26):1–14.
133. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*. 2011;44(1):104–109.
134. Wang W, Xi H, Huang M, Wang J, Fan M, Chen Y, Shao H, Li X. Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. *J Thorac Dis*. 2014;6(5):524–533.

135. Wallet F, Loïez C, Renaux E, Lemaitre N, Courcol RJ. Performances of Vitek 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4402–4406.
136. Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Böddinghaus B, Altwegg M, Böttger EC. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1359–1366.
137. Brisse S, Stefani S, Verhoef J, Van Belkum A, Vandamme P, Goessens W. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1743–1748.
138. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1549–1554.
139. Dubois D, Grare M, Prere M, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2568–2576.
140. Manji R, Bythrow M, Branda J, Burnham CAD, Ferraro MJ, Garner OB, Jennemann R, Lewinski MA, Mochon AB, Procop GW, Richter SS, Rychert JA, Sercia L, Westblade LF, Ginocchio CC. Multi-center evaluation of the Vitek[®] MS system for mass spectrometric identification of non-*Enterobacteriaceae* Gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(3):337–346.
141. Alby K, Gilligan PH, Miller MB. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3852–3854.

142. Lambiase A, Del Pezzo M, Cerbone D, Raia V, Rossano F, Catania MR. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2013;92(2):145–149.
143. Otto-Karg I, Jandl S, Müller T, Stirzel B, Frosch M, Hebestreit H, Abele-Horn M. Validation of Vitek 2 nonfermenting gram-negative cards and Vitek 2 version 4.02 software for identification and antimicrobial susceptibility testing of nonfermenting gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3283–3288.
144. Funke G, Funke-Kissling P. Evaluation of the new Vitek 2 card for identification of clinically relevant gram-negative rods. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):4067–4071.